

# Biologische Bekämpfung des Falschen Mehltaus an der Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*)

Wirkung und Wirkweise von *Aneurinibacillus migulanus* und Federmohn-Extrakt



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doctor rerum naturalium  
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Christina Schuster  
aus Finsterwalde

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Cornelia Ullrich-Eberius

Tag der Einreichung: 06.09.2012  
Tag der mündlichen Prüfung: 01.11.2012  
Darmstadt 2012

D 17



---

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

---

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 30. August 2012

---

---

# Inhaltsverzeichnis

---

Ehrenwörtliche Erklärung .....	2
Inhaltsverzeichnis.....	I
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Biologischer Pflanzenschutz .....	1
1.2 Biological Control Agents (BCA) und Naturstoffe.....	3
1.2.1 <i>Aneurinibacillus migulanus</i> .....	3
1.2.1.1 Gramicidin S.....	5
1.2.2 Federmohn .....	7
1.2.2.1 Sanguinarin und Chelerythrin .....	8
1.3 Pflanzliche Abwehrmechanismen .....	9
1.3.1 Mögliche Mechanismen der Pathogenabwehr.....	10
1.4 Oomyceten .....	12
1.4.1 <i>Pseudoperonospora cubensis</i> .....	12
1.4.2 Bekämpfung von Oomyceten .....	15
1.5 Ziel der Arbeit .....	16
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Material.....	18
2.1.1 Nährmedien .....	18
2.1.1.1 Trypton Soja Medium (TSB, TSA) .....	18
2.1.1.2 LB (Lennox) Grundmedium.....	18
2.1.1.3 Gemüsesaft-Agar .....	19
2.1.1.4 Potato Dextrose Agar (PDA) .....	19
2.1.1.5 Miller-Schroth Medium (MS) .....	19
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	19
2.1.2.1 1x TE-Puffer .....	19
2.1.2.2 1M TRIS .....	20
2.1.2.3 Tween (0,0125 %) .....	20
2.1.2.4 physiologische Kochsalzlösung .....	20
2.1.3 PCR-Primer .....	20
2.1.4 Bakterien- und Pilzstämme .....	21
2.1.4.1 <i>Aneurinibacillus migulanus</i> .....	21
2.1.4.2 <i>Micrococcus luteus</i> .....	21
2.1.4.3 <i>Erwinia amylovora</i> .....	22
2.1.4.4 <i>Clavibacter michiganensis</i> .....	22
2.1.4.5 <i>Pseudoperonospora cubensis</i> .....	22
2.1.4.6 <i>Phytophthora infestans</i> .....	22
2.1.4.7 <i>Podosphaera xanthii</i> .....	22
2.1.4.8 <i>Botrytis cinerea</i> .....	22
2.1.4.9 <i>Fusarium graminearum</i> .....	22
2.1.5 Pflanzenmaterial.....	23
2.1.5.1 <i>Cucumis sativus</i> .....	23
2.1.5.2 <i>Macleaya cordata</i> .....	23
2.1.5.3 <i>Daucus carota</i> .....	23
2.2 Methoden .....	23
2.2.1 Pflanzenanzucht .....	23
2.2.2 Dauerkultur der Mikroorganismen und Inokulumgewinnung.....	24
2.2.2.1 <i>Aneurinibacillus migulanus</i> .....	24



2.2.2.2	<i>Micrococcus luteus</i> .....	24
2.2.2.3	<i>Erwinia amylovora</i> .....	24
2.2.2.4	<i>Clavibacter michiganensis</i> .....	25
2.2.2.5	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> .....	25
2.2.2.6	<i>Phytophthora infestans</i> .....	25
2.2.2.7	<i>Podosphaera xanthii</i> .....	26
2.2.2.8	<i>Alternaria dauci</i> und <i>A. radicina</i> .....	26
2.2.2.9	<i>Botrytis cinerea</i> .....	27
2.2.2.10	<i>Fusarium graminearum</i> .....	27
2.2.3	Präparatgewinnung .....	27
2.2.3.1	Extraktgewinnung aus <i>Macleaya cordata</i> .....	27
2.2.3.2	Gewinnung der Bakterienkulturbrühe .....	28
2.2.4	Biotests mit Falschem Mehltau ( <i>Pseudoperonospora cubensis</i> ) .....	29
2.2.4.1	Biotests allgemein .....	29
2.2.4.2	Kurative Wirkung .....	29
2.2.4.3	Translaminare Wirkung .....	29
2.2.4.4	Wirkung einzelner Bestandteile von <i>A. migulanus</i> .....	30
2.2.4.5	Einfluss des Abtrocknungseffektes auf den Befall .....	30
2.2.5	Biotests mit Echtem Mehltau ( <i>Podosphaera xanthii</i> ) .....	30
2.2.6	Wirkung des <i>M. cordata</i> -Extraktes auf <i>A. dauci</i> und <i>A. radicina</i> an Möhren .....	31
2.2.7	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Nachweis mittels DAB-Färbung .....	31
2.2.7.1	Nachweis in Blattscheiben .....	31
2.2.7.2	Nachweis in ganzen Pflanzen .....	32
2.2.8	Prüfung auf phytotoxische Wirkung der Präparate .....	33
2.2.9	Wirkung der Präparate auf Oomyceten .....	33
2.2.9.1	Einfluss auf den Zoosporenschlupf von <i>P. infestans</i> .....	33
2.2.9.2	Einfluss der Präparate auf Zoosporen von <i>P. infestans</i> .....	33
2.2.9.3	Keimungstest von <i>P. cubensis</i> auf Blattscheiben .....	34
2.2.10	Analytische Methoden .....	34
2.2.10.1	Massenspektrometrie .....	34
2.2.10.2	Fettsäureanalytik .....	35
2.2.11	Mikrobielle Methoden .....	35
2.2.11.1	Zellzahlbestimmung .....	35
2.2.11.2	Radialwachstumstest mit Pilzen .....	35
2.2.11.3	Agardiffusionstest mit Bakterien .....	36
2.2.12	Nachweis und Bestimmung von Gramicidin S .....	36
2.2.12.1	Gramicidinextraktion für die Hemmhoftests .....	36
2.2.12.2	Hemmhoftest .....	37
2.2.12.3	Gramicidinextraktion für Dünnschichtchromatographie .....	38
2.2.12.4	Dünnschichtchromatographie .....	38
2.2.13	Molekularbiologische Methoden .....	39
2.2.13.1	DNA Isolierung aus Blattmaterial von <i>Cucumis sativus</i> .....	39
2.2.13.2	DNA Isolierung aus <i>A. migulanus</i> mit Hilfe der Chelex-Methode .....	39
2.2.13.3	Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	40
2.2.13.4	Gelelektrophorese .....	41
2.2.13.5	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	41
2.2.13.6	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	42
2.2.13.7	Sequenzierung .....	42
2.2.13.8	Vorbereitung quantitative Real-Time PCR .....	42
2.2.13.9	RNA-Isolierung .....	43
2.2.13.10	Denaturierende RNA Gelelektrophorese .....	43
2.2.13.11	DNase Verdau .....	44
2.2.13.12	Reverse Transkription (RT-PCR) .....	45
2.2.13.13	Quantitative Real-TimePCR (qRT-PCR) .....	45

2.2.14	Statistische und bioinformatische Datenanalyse .....	46
2.2.14.1	Befallsauswertung .....	46
2.2.14.2	Berechnung EC <sub>50</sub> .....	47
2.2.14.3	Signifikanztests .....	47
2.2.14.4	Phylogenetische Rekonstruktion und p-Abstandsmatrix .....	47
2.2.15	Fotobearbeitung .....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	Wirkung und Wirkweise des Extraktes aus <i>Macleaya cordata</i> und der Bakterienkultur aus <i>Aneurinibacillus migulanus</i> .....	49
3.1.1	Bestimmung der effektiven Konzentration (EC <sub>50</sub> ) .....	49
3.1.2	Protektive und kurative Wirkung.....	52
3.1.3	Translaminare Wirkung .....	53
3.1.4	Wirkung der einzelnen Bestandteile einer <i>A. migulanus</i> -Flüssigkultur .....	55
3.1.5	Einfluss des Abtrocknungseffektes auf den Befall mit <i>P. cubensis</i> .....	56
3.1.6	Massenspektrometrie der Überstände von <i>A. migulanus</i> weiß und E1 .....	60
3.1.7	Kombination des Pflanzenextraktes mit der Flüssigkultur.....	61
3.1.8	Abhängigkeit der Wirkung von <i>A. migulanus</i> weiß vom Gramicidin S Gehalt ....	63
3.1.8.1	Gramicidinbestimmung von <i>A. migulanus</i> weiß aus Versuch 3.1.1 .....	63
3.1.8.2	Abhängigkeit des Wirkungsgrades vom Gramicidingehalt.....	64
3.1.9	Einfluss der Präparate auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Bildung in Gurkenpflanzen.....	65
3.1.9.1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung an Blattscheiben .....	65
3.1.9.2	Phytotoxische Wirkung der Präparate an Blattscheiben.....	69
3.1.9.3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung bei Behandlung von Ganzpflanzen .....	73
3.1.10	Wirkung auf Oomyceten.....	75
3.1.10.1	Einfluss auf das Myzelwachstum von <i>P. infestans</i> .....	75
3.1.10.2	Einfluss auf den Zoosporenschlupf und die Zoosporen von <i>P. infestans</i> .....	77
3.1.10.3	Keimungstest auf Blattscheiben .....	79
3.1.11	Transkriptionsanalyse von Abwehrproteinen der Pflanze .....	80
3.1.11.1	RNA Isolierung .....	80
3.1.11.2	Primertest mit der cDNA von <i>C. sativus</i> .....	81
3.1.11.3	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	82
3.2	Kultivierung von <i>A. migulanus</i> .....	86
3.2.1	Vergleich von Flüssig- und Festfermentation von <i>A. migulanus</i> weiß .....	86
3.2.1.1	Bestimmung der cfu .....	86
3.2.1.2	Bestimmung des Gramicidingehaltes.....	87
3.2.1.3	Wirkung im Biotest.....	88
3.2.2	Vergleich der Kultivierung von <i>A. migulanus</i> für die Praxisversuche.....	89
3.3	Phylogenetische und taxonomische Einordnung von <i>A. migulanus</i> Phänotypen .....	93
3.3.1	Phänologische Beschreibung.....	93
3.3.2	Dünnschichtchromatographie.....	94
3.3.3	Gramicidin S-Bestimmung .....	95
3.3.4	Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	96
3.3.5	Bestimmung der Anzahl Sporen .....	97
3.3.6	Wirkung im Biotest an Gurken .....	99
3.3.7	Einordnung der verschiedenen Stämme mittels Fettsäureanalyse .....	100
3.3.8	Phylogenetische Einordnung der verschiedenen Stämme .....	101
3.3.8.1	Gelchromatographie .....	101
3.3.8.2	Phylogenie.....	102
3.3.8.3	p-Abstandsmatrix .....	104
3.4	Wirkung von <i>M. cordata</i> gegen weitere Phytopathogene.....	106

3.4.1	Wirkung gegen <i>P. xanthii</i> an Gurke im Biotest .....	106
3.4.2	Wirkung als Saatgutbeizmittel gegen Möhrenschrärze.....	107
3.4.3	<i>In vitro</i> Versuche gegen phytopathogene Pilze.....	108
3.4.3.1	<i>Botrytis cinerea</i> .....	108
3.4.3.2	<i>Fusarium graminearum</i> .....	109
3.4.4	<i>In vitro</i> Versuche gegen verschiedene Bakterien .....	110
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>111</b>
4.1	Wirkung und Wirkweise des Extraktes aus <i>M. cordata</i> und der Bakterienkultur aus <i>A. migulanus</i> .....	111
4.1.1	Extrakt aus <i>M. cordata</i> .....	111
4.1.2	<i>A. migulanus</i> -Flüssigkultur.....	113
4.1.2.1	Wirkung der einzelnen Bestandteile der Flüssigkultur.....	114
4.1.2.2	Gramicidinbestimmung mit Hilfe des Hemmhoftest.....	117
4.1.3	Kombination des Pflanzenextraktes mit der Bakterien-Flüssigkultur .....	119
4.1.4	Wirkweisen der Präparate.....	120
4.1.4.1	Wirkung auf Oomyceten.....	120
4.1.4.2	Translaminare Wirkung.....	124
4.1.4.3	Einfluss auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung in Gurkenpflanzen.....	125
4.1.4.4	Transkriptionsanalyse von Abwehrproteinen.....	127
4.1.4.5	Protektive und kurative Wirkung.....	130
4.1.4.6	Zusammenfassung der Wirkweise .....	130
4.2	Phylogenetische und taxonomische Einordnung von <i>A. migulanus</i> Phänotypen .....	133
4.2.1	Fettsäureanalyse und phylogenetische Einordnung .....	133
4.2.2	Bestimmung der Anzahl der vegetativer Zellen und Sporen .....	135
4.2.3	Bestimmung des Gramicidin S-Gehaltes .....	137
4.2.4	Untersuchung der Wirkung im Biotest an Gurken .....	137
4.3	Kultivierung von <i>A. migulanus</i> .....	138
4.4	Wirkung von <i>M. cordata</i> gegen weitere Phytopathogene.....	139
4.4.1	<i>In vitro</i> Versuche.....	139
4.4.2	Versuche <i>ad planta</i> .....	142
4.4.2.1	Wirkung gegen <i>P. xanthii</i> .....	142
4.4.2.2	Wirkung als Saatgutbeizmittel gegen Möhrenschrärze .....	143
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>145</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>151</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>169</b>
<b>9</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>170</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>171</b>
<b>11</b>	<b>Eigene Arbeit.....</b>	<b>172</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>V</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

$\infty$	unendlich
$\varnothing$	Durchmesser
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromol
Abb.	Abbildung
BCA	biological control agent
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bp	base pair
cDNA	complementary DNA
cfu	colony forming units
cm	Zentimeter
DAB	3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
E1	<i>A. migulanus</i> Mutante E1
EC <sub>50</sub>	effective concentration 50
g	Gramm
GS	Gramicidin S
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HR	hypersensitive response
kb	kilobases
L	Liter
min	Minute
Mpa	Megapascal
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
QBA	Quartäres Benzophenanthrinalkaloid
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
Rf-Wert	Retentionsfaktor
ROS	reactive oxygen species
rpm	rotations per minute
rRNA	ribosomale RNA
SAR	systemic acquired resistance
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TSB/ TSA	Trypton Soja Brühe/ Trypton Soja Agar
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
WT	Wildtyp
x g	Faktor von g (Erdbeschleunigung)

---

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Biologischer Pflanzenschutz

Pflanzen stellen die Grundlage allen Lebens auf der Erde dar. Sie dienen als Sauerstoffproduzenten und Klimaregulatoren, sind ein Teil der Vegetationsdecke und ein wichtiger Bestandteil der Nahrungskette. Für den Menschen stehen vor allem die Kulturpflanzen im Vordergrund, die zur Nahrungs-, Futter- und Rohstofferzeugung genutzt werden. Pflanzenwachstum, Ertragsbildung und Produktqualität können jedoch durch verschiedenste Faktoren positiv oder negativ beeinflusst werden. Diese Faktoren können abiotischer oder biotischer Natur sein [HALLMANN et al. 2007].

Zu den negativen abiotischen Faktoren zählen Umwelteinflüsse. Dazu gehören Witterungsbedingungen wie Trockenheit, Frost, Überschwemmungen, Wind oder Hagel. Diese Faktoren können zu regional begrenzten Totalausfällen führen und sind vom Menschen meist nicht beeinflussbar. Neben der direkten Schädigung der Pflanzen kann es auch zu indirekten Schäden kommen, indem geschwächte Pflanzen anfälliger für Schadorganismen werden [HALLMANN et al. 2007].

Negative biotische Faktoren sind parasitische Pflanzen, tierische Schaderreger, Arthropoden, Viren, Bakterien und Pilze [SCHÖNBECK 1979]. Phytopathogene können große Verluste verursachen. So wird geschätzt, dass etwa 14 % der Ernteverluste allein durch Pflanzenkrankheiten verursacht werden [AGRIOS 2008]. Die durch die Globalisierung immer stärkere Verbreitung von Pflanzen und Lebensmitteln führte zu einem Anstieg der Verbreitung von Krankheitserregern. Auch der Anstieg der Temperaturen durch den sogenannten Klimawandel führte dazu, dass Ökosysteme anfällig wurden für eingewanderte Krankheitserreger [BAAYEN & ARIJS 2011].

Pflanzenkrankheiten werden seit etwa 100 Jahren traditionell durch chemisch-synthetische Pflanzenschutzmittel bekämpft. Ende des 19. Jahrhunderts wurden erste Bestrebungen unternommen, Mittel zur Bekämpfung von Schadpilzen zu finden [HAUG et al. 1990]. Die Konsequenzen des großen Vertrauens in chemische Bekämpfungsmittel waren jedoch die Resistenzausbildung bei den Pathogenen und damit der Wirkungsverlust der Pflanzenschutzmittel, die Bioakkumulation in die Nahrungskette, ein Verlust der Biodiversität, Gefahren für die Umwelt sowie Risiken für die Gesundheit von Mensch und Tier [BALE et al. 2008]. Aufgrund eines wachsenden ökologischen Bewusstseins der Menschen und durch die zunehmende Zahl an Nachrichten über bedenkliche Substanzen in Lebensmitteln gewinnt daher der ökologische Landbau immer mehr an Bedeutung [KÜHLHEIM 1987]. Diesen Punkt

---

greift auch die neue Pflanzenschutzmittelverordnung (VO (EG) Nr. 1107/2009) der Europäischen Union auf, welche am 14. Juni 2011 in Kraft getreten ist. Sie soll vor allem die Anforderungen der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln in der Europäischen Union vereinheitlichen. Einige wichtige Punkte der neuen Verordnung sind dabei die Erhöhung des Schutzniveaus für Verbraucher, Anwender und die Umwelt, eine größere Harmonisierung bei der Bewertung und Zulassung von Pflanzenschutzmitteln sowie Verbesserungen beim Schließen von Bekämpfungslücken [www.bmelv.de, EG Nr. 1107/2009]. Zum Schutz der Gesundheit von Mensch und Tier und der Umwelt sollen Pflanzenschutzmittel unter Beachtung der Grundsätze des integrierten Pflanzenschutzes zugelassen werden. Dabei ist den nicht chemisch-synthetischen und natürlichen Alternativen Vorrang zu gewähren [VO (EG) Nr. 1107/2009]. Der bevorzugte Einsatz eines chemische-synthetischen Pflanzenschutzmittels gegenüber einer nichtchemischen Methode ist nur bei ernsthafter Gefahr für die Pflanzengesundheit und nach genauer Prüfung erlaubt. Gleichzeitig sind die Mitgliedstaaten der EU dazu angehalten, einen Plan zur Kontrolle dieser Gefahr mit alternativen Pflanzenschutzmitteln auszuarbeiten, welcher die nichtchemischen Methoden einschließt [EG Nr. 1107/2009]. Durch die neuen Richtlinien der EU wird es in den nächsten Jahren zu einem massiven Wegfall von Pflanzenschutzmitteln auf chemisch-synthetischer Basis kommen.

Zu den Grundsätzen des ökologischen Landbaus gehören neben einer bewussten Auswahl resistenter Sorten und der Anwendung besonderer Kulturmaßnahmen das Verbot chemisch synthetisierter Pflanzenschutzmittel und der Ausschluss gentechnisch veränderter Organismen [KÜHNE et al. 2006]. Durch die Förderung des ökologischen Landbaus haben sich die Flächen, auf denen nach EG-Rechtsvorschriften ökologisch gewirtschaftet wird, von 2,1 % im Jahr 1996 auf heute 5,9 % (2010) der Gesamtagrarfläche in Deutschland erhöht [www.oekolandbau.de A]. Es ist zu erwarten, dass der Zuwachs an ökologisch wirtschaftenden Betrieben weiter anhält. Im ökologischen Landbau spielt der Biologische Pflanzenschutz eine bedeutende Rolle.

Der Biologische Pflanzenschutz befasst sich mit der gezielten Nutzung biologischer Vorgänge. Dazu gehören der Einsatz von Makroorganismen (z.B. Raubinsekten, Parasiten, Nematoden) sowie die Nutzung von Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze) gegen Schadorganismen. Es werden auch Mittel eingesetzt, die pflanzeigene Schutzmechanismen aktivieren können. Dazu zählen z.B. Pflanzenextrakte. Die Nutzung von Pheromonfallen dient außerdem der Überwachung (monitoring) und der Bekämpfung von Schadinsekten. [STATUSBERICHT 2003]. Wesentliche Vorteile von biologischen Pflanzenschutzmaßnahmen liegen in der weitgehend spezifischen Wirkung auf die jeweiligen Schadorganismen sowie der niedrigen Beeinträchtigung von Nichtzielorganismen und in der guten Umweltverträglichkeit. Durch den

---

biologischen Pflanzenschutz können Lücken in den Indikationen geschlossen werden, in denen chemisch-synthetische Bekämpfungsmittel nicht angewendet werden dürfen (z.B. kurz vor der Ernte). Des weiteren wird dadurch das Spektrum an Bekämpfungsmöglichkeiten stark erweitert und ein Beitrag zur Reduzierung des Einsatzes chemischer Pflanzenschutzmittel geleistet [STATUSBERICHT 2003].

## 1.2 Biological Control Agents (BCA) und Naturstoffe

Eine Möglichkeit der biologischen Bekämpfung von Phytopathogenen besteht in der Nutzung von Mikroorganismen sowie von ihnen gebildeter Metaboliten, den sogenannten „Biological Control Agents“ (BCA), und durch andere Naturstoffe. Zu den BCAs gehören Pilze, Viren und Bakterien. Sie wirken durch Antibiose, Parasitieren des Pathogens (Hyperparasitismus), Kampf um Nahrung und Lebensraum. [HAUG et al. 1990].

Naturstoffe werden oft als niedermolekulare Sekundärmetabolite von Pflanzen, Bakterien und Pilzen gebildet. Sie können bakteriostatisch, bakterizid, fungitoxisch oder nematizid wirken und dienen der Verteidigung gegen konkurrierende Organismen, als Signalüberträger, Pathogenitätsfaktoren oder Siderophoren. [LAATSCH 2000, HOYER 2008]. Sie können eine direkte Wirkung auf das Pathogen haben oder über Induzierte Resistenz in der Pflanze wirken [HAUG et al. 1990, SCHMITT & SEDDON 2005].

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe fanden schon immer Anwendung in der traditionellen Medizin und in der Kosmetik [BLAESER et al 2002]. Im Pflanzenschutz wurden die sekundären Pflanzenstoffe zuerst als Insektizide genutzt [SCHMUTTERER & HUBER 2005]. Exemplarisch sei hier der Wirkstoff Azadirachtin genannt, welcher aus der tropischen Pflanze *Azadirachta indica* (Neem-Baum) gewonnen wird [SCHMUTTERER 1990]. Ein weiterer bekannter Wirkstoff ist das Pyrethrum, welches aus *Chrysanthemum cinerariaefolium* extrahiert wird. Er wird sowohl gegen Pflanzenschädlinge als auch gegen Vorratsschädlinge eingesetzt [SCHMUTTERER & HUBER 2005].

### 1.2.1 *Aneurinibacillus migulanus*

Bacillus-Arten zeigen in biologischen Screenings immer wieder Eigenschaften, die sie für einen Einsatz als BCA verwendbar machen [WALKER et al. 1998]. Sie sind durch ihre Fähigkeit Dauersporen zu bilden besonders gut geeignet, da sie dadurch unwirtliche Umweltbedingungen überdauern können [EDWARDS et al. 1994, WALKER et al. 1998]. Sie

---

sind resistent gegenüber hohen Temperaturen, Chemikalien und radioaktiver Strahlung. Dies ermöglicht es ihnen, unter extremen Bedingungen, z.B. auf Blattoberflächen oder in Formulierungsvorgängen, überlebensfähig zu bleiben [SCHMITT & SEDDON 2005]. Häufig werden auch Metaboliten produziert, welche antibiotisch oder pflanzenstärkend wirksam sind. Durch die Metaboliten, welche von *Bacillus subtilis* FZB24<sup>®</sup> gebildet werden, wird eine pflanzenstärkende Wirkung hervorgerufen und es kommt zur Förderung des Pflanzen- und Wurzelwachstums [KILIAN et al. 2000]. *Aneurinibacillus migulanus* gehört zu den Bakterien, welche für den Pflanzenschutz einsetzbare Metaboliten produzieren. Es ist ein Gram-positives Bakterium, das Endosporen bilden kann. *A. migulanus* wird in die Familie der *Paenibacillen* und hier in die Gattung der Aneurinibacillen eingeordnet [www.bergeys.org].

Die systematische Einordnung ist zur Zeit folgende:

Domäne: *Bacteria*  
Stamm: *Firmicutes*  
Klasse: *Bacilli*  
Ordnung: *Bacillales*  
Familie: *Paenibacillaceae*  
Gattung: *Aneurinibacillus*  
Art: *Aneurinibacillus migulanus* [www.bergeys.org].

Der Originalbakterienstamm wurde im Jahr 1942 in Russland aus Boden isoliert [GAUSE & BRAZHNKOVA 1944]. Dieser Stamm zeigte eine Wirkung gegen humanpathogene Staphylococcenstämmen und wurde damals als *Bacillus brevis* var. G.B. beschrieben. Der phylogenetische Status von *B. brevis* änderte sich danach im Laufe der Jahre mehrere Male. [BERDITSCH et al. 2007]. *A. migulanus* (früher *B. brevis*) ist in der American Type Culture Collection unter dem Namen ATCC 9999 hinterlegt. In der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen ist er unter DSM 2895 zu finden [BERDITSCH et al. 2007].

Neuere taxonomische Untersuchungen von TAKAGI et al. [1993] ordneten den Typenstamm aus der amerikanischen Sammlung (ATCC 9999<sup>T</sup>), der hier als *Bacillus brevis* bekannt war, der neuen Art *Bacillus migulanus* sp. nov. zu. Im Jahr 1996 führten SHIDA et al. [1996] erneut taxonomische Untersuchungen basierend auf 16S rRNA kodierenden Genen durch und reklassifizierten das Bakterium als *Aneurinibacillus migulanus* comb. nov. Spätere Vergleiche basierend auf DNA-DNA Hybridisierung bestätigten ebenfalls die Zugehörigkeit des deutschen



---

Typenstammes DSM 2895<sup>T</sup> und zwei weiterer Stämmen zur Art *A. migulanus* [GOTO et al. 2004].

TAKAGI et al. [1993] beschreiben *Aneurinibacillus migulanus* als stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes Bakterium. Unter ungünstigen Umweltbedingungen bildet es eine ellipsoide Spore aus, welche sich in einem terminal geschwollenen Sporangium befindet [TAKAGI et al. 1993]. Vegetative Zellen haben eine Größe von 0,5 – 1,0 µm mal 2,0 – 6,0 µm [HEYNDRIKX et al. 1997]. *A. migulanus* wächst bei Temperaturen von 20 bis 50 °C und bei einem pH Wert von 5,5 bis 9,0 und der G+C Gehalt reicht von 42,5 bis 43,2 % [TAKAGI et al. 1993]. Es wurde positiv auf Katalase und Oxydase getestet und es reduziert Nitrat zu Nitrit. *A. migulanus* ist obligat anaerob [TAKAGI et al. 1993, HEYNDRIKX et al. 1997].

Eine Trypton-Soja-Brühe-Flüssigkultur von *A. migulanus* wirkt auf zwei Arten gegen Phytopathogene. *A. migulanus* produziert zum einen den Metaboliten Gramicidin S, der an die Sporenwand angelagert wird [LAZARDIS et al. 1981] und eine antimikrobielle Wirkung hat [GAUSE & BRAZHNIKOVA 1944, KONDEJEWSKI et al. 1996]. Zum anderen wird ein „Biosurfactant“ in das umgebende Medium abgegeben, welches die Oberflächenspannung und damit die Feuchtigkeitsdauer auf den Blättern verringert [EDWARDS 1993, SEDDON et al. 1997]. Zu diesem Biosurfactant ist jedoch noch wenig bekannt.

#### 1.2.1.1 Gramicidin S

GAUSE & BRAZHNIKOVA [1944] isolierten 1942 aus *A. migulanus* (damals noch *B. brevis*) einen Metaboliten, den sie Gramicidin S nannten. Ihre Intention war es, den Bakterienstamm, welcher das schon bekannte Tyrocidin bildete, erneut aus Boden zu isolieren. Stattdessen fanden sie einen neuen Stamm von *B. brevis*, der einen dem Tyrocidin ähnlichen Metaboliten (Gramicidin S) bildete.

Gramicidin S wird der Klasse der membranaktiven Peptidantibiotika zugeordnet, welche sich durch eine rigide Struktur und einen amphipathischen Charakter auszeichnet. Dadurch ist es ihnen möglich mit prokaryotischen Membranen Wechselwirkungen einzugehen [HOYER 2008]. Gramicidin S ist ein zyklisches Dekapeptid aus zwei repetitiven Pentapeptiden, welche die Sequenz D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu besitzen. Die sich daraus ergebende Struktur verleiht dem Molekül eine hydrophobe und eine hydrophile Seite (Abb. 1-1) [EDWARDS 1993, SALGADO et al. 2001, HOYER 2008].

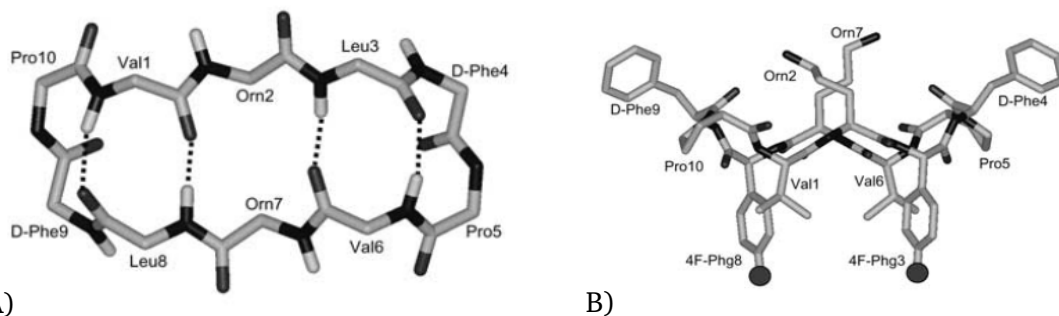


Abb. 1-1: Modelle von Gramicidin S basierend auf Untersuchungen mit radioaktiv markiertem  $^{19}\text{F}$ . A) zeigt die Grundstruktur von Gramicidin S. B) zeigt die angenommene Struktur, mit der Gramicidin S an Membranen assoziiert; hier wurde Leucin durch  $^{19}\text{F}$ -gelabeltes Phenylglycin ersetzt (aus SALGADO et al. 2001).

SALGADO et al. [2001] zeigten mittels  $^{19}\text{F}$ -markiertem GS, dass sich das Molekül flach an die Membran setzt und die positiv geladenen Ornithin-Reste mit den negativ geladenen Köpfen der Phospholipide wechselwirken. Der hydrophobe Teil des Moleküls interagiert mit den Kohlenstoffketten der Phospholipide. Untersuchungen von ASHRAFUZZAMAN et al. [2008] zeigten, dass GS-Moleküle wahrscheinlich keine klar definierten Ionenkanäle in Phospholipidmembranen bilden, wie es von linearen Gramicidinen (A – C) angenommen wird [WALLACE 1990]. JELOKHANI-NIARAKI et al. [2008] beschrieben jedoch die Möglichkeit, dass auch Gramicidin S-Moleküle in hohen Konzentrationen unspezifische, porenähnliche Strukturen in der Membran ausbilden können und sie so durchlässig machen.

Gramicidin S hat eine starke antibiotische Wirkung gegen ein breites Spektrum an Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie gegen Pilze [KONDEJEWSKI et al. 1996, HOYER 2008]. GAUSE & BRAZHNKOVA [1944] beschrieben schon sehr früh die hämolytische Eigenschaft des Moleküls, und sie setzten es als Antibiotikum zur Behandlung offener Wunden ein. Es zeigte sich, dass Gramicidin S um ein vielfaches stärker gegen Staphylococcen wirkt, als Tyrocidin. Neben der Wirkung auf humanpathogene Erreger wurde auch die Wirkung gegen Phytopathogene beschrieben. Es ließen sich unter Gewächshausbedingungen gute Ergebnisse gegen den Erreger des Grauschimmels (*Botrytis cinerea*) an Chinakohl, Salat und Tomate erzielen, sowie gegen Echten Mehltau an Gurken (*Podosphaera xanthii*) [EDWARDS 1993, SEDDON et al. 2008].

---

### 1.2.2 Federmohn

*Macleaya cordata* (syn. *Bocconia cordata* Willd.) gehört in der Familie der *Papaveraceae* zur Gattung der *Macleaya*. Der deutsche Name ist Federmohn; im englischen Sprachraum kennt man die Pflanze als „plume poppy“ [BRITTON & BROWN 1913, NEWMANN et al. 1999, KOSINA et al. 2010]. Federmohn gehört zu den ausdauernden, krautigen Pflanzen und ist 150 bis 250 cm groß. Typisch sind die Blätter, welche wechselständig stehen, rundlich-herzförmig und sieben- bis neunlappig geformt sind. Sie haben einen Durchmesser von etwa 20 cm. Seinen Namen hat der Federmohn von seinen federartigen, rispigen Blütenständen, welche in den Sommermonaten zu sehen sind. Die Blüten sind zwittrig und stehen auf bis zu 10 cm langen Blütenstielen. Sie sind weißlich bis beige gefärbt. Es wird eine 15 bis 20 mm große Kapsel Frucht mit vier bis sechs Samen ausgebildet. *M. cordata* kann sich aber auch über Rhizome vermehren [HUXLEY & GRIFFITHS 1992, GREY-WILSON 1993, [www.eFloras.org](http://www.eFloras.org)]. Die Pflanze stammt ursprünglich aus dem asiatischen Raum und ist in Ostchina und Japan beheimatet. Dort kommt sie in den Bergen, Schluchten und den Ebenen vor [MAKINO 1948, GREY-WILSON 1993]. Sie wurde unter anderem in der traditionellen chinesischen Medizin als Heilpflanze genutzt [GREY-WILSON 1993, CHEN et al. 2009]. In den gemäßigten Zonen wird Federmohn auch als Zierpflanze angepflanzt. Dadurch kam es weltweit zu einer Ausbreitung des Federmohns [BRITTON & BROWN 1913].

Die systematische Einordnung ist zur Zeit folgende:

Domäne: *Plantae*  
Stamm: *Magnoliophyta*  
Klasse: *Magnoliopsida*  
Ordnung: *Papaverales*  
Familie: *Papaveraceae*  
Gattung: *Macleaya*  
Art: *Macleaya cordata*

Der aus den Stengeln austretende Milchsaft enthält viele Alkaloide aus der Familie der Isochinolinen Alkaloide. Die vier wichtigsten, neben einer Vielzahl von Stoffen, sind Sanguinarin, Chelerythrin, Dihydrosanguinarin und Dihydrochelerythrin [STIPOROVA et al. 2008, CHEN et al. 2009, KOSINA et al. 2010]. In Deutschland wird ein Extrakt aus Federmohn in einem Tierfutterzusatzstoff unter dem Namen Sangrovit® von der Firma Phytobiotics GmbH [[www.phytobiotics.com](http://www.phytobiotics.com)] vertrieben. Sangrovit® verspricht ein breites

---

Spektrum an Wirksamkeit, darunter fallen antimikrobielle Aktivitäten, Modellierung des Immunsystems, anticholesterinesterase Aktivitäten und eine generelle Verbesserung des Gesundheitsstandes der Tiere [www.phytobiotics.com, TSCHIRNER 2004, PSOTOVA et al. 2006].

#### 1.2.2.1 Sanguinarin und Chelerythrin

Sanguinarin und Chelerythrin sind pflanzliche Alkaloide, die zu den quartären Benzophenanthridinalkaloide (QBA) gehören. QBAs gehören zu einer großen Gruppe von isochinolininen Alkaloiden, welche aus Phenylalanin synthetisiert werden [HARKRADER et al. 1990]. Alkaloide sind allgemein organische stickstoffhaltige Verbindungen, welche z.B. als Sekundärmetaboliten in Pflanzen gefunden werden [MACKRAJ et al. 2008].

Die in *M. cordata* vorkommenden Alkaloide haben ein weites Spektrum an biologischen Aktivitäten. So zeigen sie z.B. eine antimikrobielle, antifungale, entzündungshemmende oder lokalanästhetische Wirkung. Sie hemmen Proteasen und sind gegen verschiedene (tierische) normale sowie Tumorzellen zytotoxisch [WALTEROVÁ et al. 1995, MALIKOVA et al. 2006, LIU et al. 2009, OUYANG et al. 2010]. Die Einsatzmöglichkeiten des Extraktes aus *M. cordata* liegen nicht nur im human- und tiermedizinischen Bereich. Auch eine Anwendung als Pflanzenschutzmittel ist denkbar. LIU et al. [2009] demonstrierten in ersten Versuchen unter *in vitro* Bedingungen eine starke antifungale Wirkung gegen *Rhizoctonia solani*, den Erreger der Wurzeltöterkrankheit. Sie beobachteten auch die Hemmung der Sporenkeimung bei *Magnaporthe oryzae* (Reisbrand). Die Wirkung gegen die phythopathogenen Bakterien *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas lachrymans* und *Xanthomonas vesicatoria* war mit der von Streptomycinsulfat vergleichbar [LIU et al. 2009].

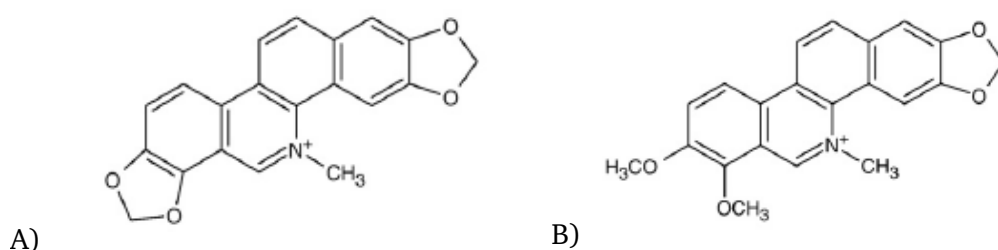


Abb. 1-2: Kationische Formen der Hauptalkaloide aus *M. cordata*; A = Sanguinarin, B = Chelerythrin (aus KOSINA et al. 2010).

---

### 1.3 Pflanzliche Abwehrmechanismen

Die Disposition von Pflanzen gegenüber ihren Krankheitserregern kann sich in einer Nichtwirtbeziehung oder in einer Affinität ausdrücken. Bei einer Affinität besitzt die Pflanze entweder die Fähigkeit das Eindringen und Wachstum des Pathogens zu hemmen (inkompatible Wirt-Pathogen-Beziehung) oder sie ist anfällig für den Krankheitserreger und wird von ihm besiedelt (kompatible Wirt-Pathogen-Beziehung) [HEIL & BOSTOCK 2002, BÖRNER et al. 2009].

Eine inkompatible Wirt-Pathogen-Beziehung zeichnet sich durch verschiedene Abwehrmaßnahmen der Pflanzen gegenüber den Krankheitserregern aus. Es gibt präinfektionelle Abwehrmechanismen, zu welchen natürlich vorkommende Pflanzeninhaltsstoffe zählen. Diese Substanzen können Terpene, phenolische Substanzen, Cumarin- und Flavonderivate und andere organische Verbindungen sein, die entweder aus den Pflanzenorganen ausgeschieden werden oder als inaktive Form in den Pflanzenzellen vorliegen [HALLMANN et al. 2007, BÖRNER et al. 2009]. Präinfektionelle Abwehrmechanismen greifen vor dem Eindringen des Pathogens in die Pflanze.

Bei postinfektionellen Abwehrmechanismen unterscheidet man die Überempfindlichkeitsreaktionen („hypersensitive response“ oder HR) von der induzierten Resistenz (IR) und sie werden durch pathogene Organismen, durch Stoffwechselmetabolite aus Mikroorganismen oder Pflanzen oder durch bestimmte Chemikalien ausgelöst [SCHÖNBECK 1993, FRITZ 1996, Van LOON 1998].

Der „hypersensitive response“ (HR) ist das Ergebnis einer sehr schnellen Mobilisierung einer Kaskade von Abwehrmaßnahmen in befallenen und umgebenen Zellen. Es kommt zu einem Ausstoß von toxischen Substanzen, welche die befallene Zelle, umgebenen Zellen und auch das Pathogen abtöten können [HASEGAWA et al. 2010]. Pathogenen mit biotropher Lebensweise wird dadurch die Nahrungsgrundlage entzogen und es werden viele kleine Nekrosen gebildet sowie Trennschichten aufgebaut [HALLMANN et al. 2007]. Eine hypersensitive Reaktion kann innerhalb von 30 – 150 min nach Penetration der Zellwand schon vollständig durchlaufen sein [BRADLEY et al. 1992, ELSTNER et al. 1996].

Induzierte Resistenz (IR) ist die Aktivierung oder Steigerung von in der Pflanze latent vorliegender Resistenzmechanismen [SCHÖNBECK 1993, VAN LOON 1997]. Die Aktivierung wird durch verschiedene Elicitoren ausgelöst [BLECHERT et al. 1995, VAN LOON 1998, GALLETTI et al. 2009]. Induzierte Abwehrreaktionen sind spezifischer gegen die Phytopathogene als präinfektionelle Abwehrmechanismen [FRITZ 1996] und beinhalten die Produktion von Phytoalexinen, PR-Proteinen und reaktiven Sauerstoffspezies [GALLETTI et al.

---

2009]. Da das genetische Potential für diese Abwehrreaktionen in der Pflanze schon vorliegt [SCHÖNBECK 1993], wird die induzierte Resistenz häufig mit dem tierischen Immunsystem verglichen. Die Erkennungsmechanismen von Pathogenen des sogenannten angeborenen Immunsystems („innate immune system“) sind bei Pflanzen und Tieren sehr ähnlich [NÜRNBERGER et al. 2004, GALLETTI et al. 2009].

Resistenzerscheinungen können sich zum einen nur lokal an der Penetrationsstelle des Pathogens manifestieren. Diese Erscheinung wird als „local acquired resistance“ (LAR) bezeichnet. Zum anderen gibt es Resistenzerscheinungen, die auch entfernt von der Penetrationsstelle messbar sind und sich systemisch über die ganze Pflanze erstrecken. Sie werden „systemic acquired resistance“ (SAR) genannt [RYALS 1994]. Die SAR wird in drei Phasen eingeteilt. Die ersten zwei Phasen beinhalten die Erkennung des Pathogens und die Einleitung erster lokaler Abwehrmaßnahmen. Dieser Prozess kann innerhalb von Sekunden bis Stunden ablaufen. Phase drei ist gekennzeichnet durch die Weiterleitung von Signalen und der Aktivierung von Abwehrmaßnahmen in entfernten Geweben. Sie wird erst nach mehreren Stunden bzw. Tagen beobachtet [BLECHERT et al. 1995, BONASERA et al. 2006].

Resistenzinduktoren könnten besonders für den integrierten und biologischen Landbau an Bedeutung gewinnen, da hiermit die Verringerung des Einsatzes chemisch-synthetischer Pflanzenschutzmittel möglich ist [SCHÖNBECK 1993, VAN LOON et al. 1998].

### **1.3.1 Mögliche Mechanismen der Pathogenabwehr**

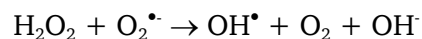
Ein erstes Hindernis für das Eindringen eines Pathogens in die Pflanze stellen strukturelle Barrieren dar. Dazu gehören zum Beispiel die Ausbildung von Kalloseablagerungen, Thyllen, Korkzellen, gummiartigen Substanzen oder die Verstärkung der Zellwände [ELSTNER et al. 1996, FRITZ 1996].

Auf biochemischem Wege werden nach Eindringen des Pathogens unter anderem Phytoalexine gebildet. Phytoalexine sind niedermolekulare Substanzen, welche eine breite Wirkung gegen verschiedene Pathogene haben und zu den sekundären Pflanzenstoffen gehören. Sie sind chemisch sehr unterschiedlich und leiten sich von phenolischen Inhaltstoffen ab. Die Phenyl-Ammonium-Lyase (PAL) stellt ein Schlüsselenzym in der Synthese der Phytoalexine dar [HALLMANN et al. 2007]. Zu ihnen gehören z.B. Phenolderivate, Terpenoide, Alkaloide und Isoflavonoide [GRAYER & KOKUBUN 2001]. Phytoalexine treten bei einer hypersensitiven Reaktion auf und werden in bestimmten Wirtszellen akkumuliert [MÜLLER & BÖRGER 1940].

---

Es ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Antwort auf Pathogenbefall spielen [DAT et al. 2000]. DOKE [1983] zeigte als erster, dass Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) an der Induktion der HR in Kartoffelknollen nach Infektion mit *P. cubensis* direkt beteiligt waren. Der sogenannte „oxidative burst“, bei dem reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt werden ( $O_2^-$  und  $H_2O_2$ ) hat aber noch weitere Funktionen in der Pflanze. Es wird angenommen, dass es durch ROS zur direkten Abtötung der Pathogene im Apoplasten kommen kann. Auch kann  $H_2O_2$  als Substrat für den schnellen Einbau von Proteinen und Lignin in die Zellwand dienen oder als endogenes Signal für die Induktion von Abwehrgenen fungieren [LEVINE et al. 1994, ALVAREZ et al. 1998].

Freie Sauerstoffradikale und andere reaktive Sauerstoffspezies entstehen bei biologischen Redoxreaktionen in der Pflanze. Unter Anwesenheit von Metallionen entstehen dann bei der Haber-Weiss-Reaktion aus Wasserstoffperoxid und Hydroxid-Anionen Hydroxyl-Radikale [FRITZ 1996, DAT et al. 2000].



Hydroxyl-Radikale sind sehr reaktiv und können Proteine, DNA und Lipide zerstören auch der Pflanze [ELSTNER 1982, DAT et al. 2000]. Aufgrund dieser zytotoxischen Wirkungen ist in den Zellen ein antioxidatives Abwehrsystem vorhanden. Dieses besteht aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Bestandteilen [FRITZ 1996]. Zu den wichtigsten Enzymen zählen z.B. Superoxiddismutase (SOD), die Catalase (CAT) und Peroxidasen (POD). Sind ROS an der Pathogenabwehr beteiligt, wären daher auch immer Aktivitätsänderungen  $H_2O_2$ -bildender und -verbrauchender Enzyme zu erwarten [FRITZ 1996], die über verschiedene Methoden nachgewiesen werden können [FRITZ 1996, THORDAL-CHRISTENSEN et al. 1997, MÜLLER 2002].

Die Induzierte Resistenz zeichnet sich auch durch die Akkumulation von sogenannten „pathogenesis-related proteins“ (PR-Proteine) aus. Sie sind konstitutiv in den Pflanzen vorhanden. Pflanzen können jedoch aktiv die Stärke der Expression spezifischer PR-Gene als Antwort auf spezifische Pathogene regulieren [BONASERA et al. 2006]. Bei den PR-Proteinen handelt es sich um sehr kleine Proteine, die in basischer Form in der Vakuole oder in saurer Form in der interzellulären Matrix vorliegen. Es wurden bislang 17 Familien von PR-Proteinen beschrieben [GUEVARA-MORATO et al. 2010]. Bekannt sind die Glucanasen (z.B. PR-2) [WARD et al. 1991a], Chitinasen (z.B. PR-3) [PAYNE et al. 1990] oder Proteinaseinhibitoren (z.B. PR-6) [Van LOON et al. 1994]. PR-Gene spielen eine Rolle in der Pathogenabwehr und ihre Induktion wird als Marker bei der Untersuchung der IR genutzt [WARD et al. 1991b].

---

## 1.4 Oomyceten

Das Phylum *Oomycota* ist eine sehr diverse Gruppe eukaryotischer Organismen, die weltweit zu finden sind und viele Nischen besetzen. Die Oomyceten unterscheiden sich durch verschiedene Merkmale von allen anderen Pilzen. Sie zeichnen sich durch siphonale Thalli aus, die meist Wände aus Cellulose besitzen. Das Zellwandprotein enthält Hydroxyprolin, welches über den Diaminopimelinsäure-Weg gebildet wird. Bei Oomyceten wurden bisher noch keine Pigmente gefunden, weshalb sie alle weitgehend farblos sind. Sie pflanzen sich über eine Gametangiogamie fort, aus der sich nach der Befruchtung in den Oogonien die Zygote entwickelt. Bei ungeschlechtlicher Vermehrung können Zoosporen ausgebildet werden, welche heterokont (dh. mit einer Peitschen- und einer Flimmergeißel) begeißelt sind. Oomyceten treten durchweg als Diplonten auf. Es lassen sich viele Ähnlichkeiten zu den autotroph lebenden Algen vom Typ der Heterokontophyta feststellen [SITTE et al. 2002]. Aus diesem Grund sind einige Autoren auch geneigt, die Oomyceten den Algen zuzuordnen [KUMAR & RZHETSKY 1996, KAMOUN et al. 1999, DICK 2001, SITTE et al. 2002].

Zu der basalsten Gruppe der *Oomycota* gehören marine Parasiten von Seegräsern. Über 60 % der bisher bekannten Arten sind Pflanzenparasiten [THINES & KAMOUN 2010]. Der wohl berühmteste Oomycet ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel (*Phytophthora infestans*), der, etwa 1842 aus Amerika eingeschleppt, in den Jahren 1845/46 für große Hungersnöte in Irland, aber auch auf dem europäischen Festland verantwortlich war [SCHÖBER-BUTIN 2001, SITTE et al. 2002].

Oomyceten werden in SITTE et al. [2002] in drei Ordnungen eingeteilt: die Saprolegniales, die Leptomitales und die Peronosporales. In der Ordnung der Peronosporales befinden sich Parasiten, die vorwiegend höhere Landpflanzen zum Wirt haben und viele Krankheiten an Kulturpflanzen hervorrufen. Zu ihnen zählen wichtige Phytopathogene wie der Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel (*Phytophthora infestans*) oder des Falschen Mehltau an Weinreben (*Plasmopara viticola*), welche einen hohen wirtschaftlichen Schaden verursachen können [SITTE et al. 2002, GISI & SIEROTZKI 2008].

### 1.4.1 *Pseudoperonospora cubensis*

Die Erreger des Falschen Mehltaus bilden die größte Gruppe in der Ordnung der *Peronosporales* und sie verursachen hauptsächlich Blattkrankheiten. Vertreter der Gruppe befallen junge, grüne Blätter aber auch Früchte. Sie gehören alle zur Familie der *Peronosporaceae* und sind obligate Parasiten höherer Pflanzen. Darunter fallen viele



---

Getreidearten, Gemüse, Feldfrüchte, Zierpflanzen, Sträucher und Weinpflanzen [LEBEDA & WIDRLECHNER 2003, AGRIOS 2008]. Die Erreger des Falschen Mehltaus sind, wie alle Mitglieder der *Peronosporaceae*, obligat biotroph und daher im Wachstum und der Vermehrung immer auf ihre Wirtspflanze angewiesen [LEBEDA & COHEN 2011].

*Pseudoperonospora cubensis* [(Berkeley & Curtis) Rostovzev] ist der Auslöser des Falschen Mehltaus an der Gurke. *P. cubensis* hat einen weiten Wirtskreis und kann etwa 50 verschiedene Gattungen von Kürbisgewächsen befallen. Dazu gehören unter anderem Gurken, Kürbisse und Melonen [LEBEDA & WIDRLECHNER 2003, RUNGE & THINES 2010]. Die Befallssymptome können dabei je nach Wirtspflanze variieren [RUNGE & THINES 2010]. *P. cubensis* ist geografisch weit verbreitet und kann zu signifikanten Ernteaufschlägen führen.

In den ersten Stadien tritt der Falsche Mehltau an der Gurke in Form chlorotischer Flecken in Erscheinung, die nekrotisieren und von den Blattadern begrenzt werden. Das gibt den Nekrosen oft eine rechteckige Form [SAVORY et al. 2011]. An infizierten Blättern ließen sich mittels einer Wärmebildkamera Änderungen der Temperatur und der Transpiration feststellen [LINDENTHAL et al. 2005]. Mit dem Fortschreiten der Infektion kommt es zu einer vollständigen Nekrotisierung der Blätter, wodurch unter anderem die Photosynthese stark beeinträchtigt wird und es zum Absterben der ganzen Pflanze kommen kann [LEBEDA & COHEN 2011].

Bei niedriger Temperatur und einer relativen Luftfeuchte von etwa 90 % wachsen auf der Blattunterseite Sporangiothecien in Gruppen von bis zu sechs aus den Stomata aus und bilden einen grauen Rasen [SAVORY et al. 2011]. Sie tragen zitronenförmige Sporangien, aus denen heterokont begeißelte Zoosporen schlüpfen. Die Sporangiothecienbildung ist abhängig vom Tag-Nacht Zyklus und benötigt eine Dunkelperiode, welche mindestens sechs Stunden anhalten muss [COHEN 1977]. Optimale Temperaturen für die Sporangienbildung liegen zwischen 15 und 20 °C [SAVORY et al. 2011]. Die Sporangien werden dann mit dem Wind oder durch Regen verbreitet und gelangen so auf neue Wirtspflanzen.

Für die Freisetzung der Zoosporen ist eine hohe Blattfeuchte notwendig. Unter optimalen Temperaturbedingungen von 15 °C und einer Feuchtigkeitsperiode von mindestens zwei Stunden werden 2 bis 15 Zoosporen entlassen [PALTI & COHEN 1980, COHEN 1981]. Sie schwimmen bevorzugt in Richtung geöffneter Spaltöffnungen. Dort einzystieren sie sich und bilden einen Keimschlauch aus. Am Ende des Keimschlauches wird ein Appressorium gebildet und der Oomycet dringt durch die Spaltöffnung mittels einer Penetrationshyphe in das Pflanzengewebe ein [LEBEDA & COHEN 2011]. Der Pilz verbreitet sich durch die Hyphen im

---

Schwamm- und Palisadenparenchym. Es werden Haustorien ausgebildet, durch die er sich mit Nährstoffen aus den Pflanzenzellen versorgt [FRAYMOUTH 1956].

Die Inkubationszeit, vom Eindringen des Pilzes in die Pflanze bis zum Sichtbarwerden der ersten Symptome, dauert im Freiland 4 – 12 Tage abhängig von äußeren Bedingungen [COHEN 1977]. Ein vollständiger Lebenszyklus kann auf anfälligen Wirtspflanzen und unter optimalen Bedingungen alle 7 – 14 Tage durchlaufen werden [LEBEDA & COHEN 2011].

*P. cubensis* kann nicht in Regionen überwintern, in denen es starke Frostperioden gibt. Das betrifft unter anderem Zentral- und Nordeuropa. Es wird bislang angenommen, dass das Pathogen in Regionen überwintert, in denen die Winter mild sind oder in denen Gurkenpflanzen in Gewächshäusern das ganze Jahr angebaut werden können. Die Sporangien gelangen dann durch den Wind in unsere Breiten [LEBEDA & SWINN 1994]. RUNGE & THINES [2009] konnten zeigen, dass die mehrjährige Cucurbitacee *Bryonia dioica* im Labor als Wirt für den Erreger des Falschen Mehltaus der Gurke (*P. cubensis*) dienen kann. Unter Laborbedingungen gelang ihnen eine Infektion von *B. dioica* mit dem Pathogen. Dies stützt ihre Hypothese, dass *B. dioica* als potentieller Wirt eine Überwinterung des Pathogens in kälteren Regionen Europas erlaubt. Ein Fund im Freiland steht jedoch noch aus. Daher ist unklar, ob *B. dioica* für den Lebenszyklus von *P. cubensis* in unseren Breiten eine Rolle spielt. Die systematische Einordnung von *P. cubensis* ist zur Zeit folgende:

Domäne:	<i>Eukaryoten</i>
Stamm:	<i>Oomycota</i>
Klasse:	<i>Oomycetes</i>
Ordnung:	<i>Peronosporales</i>
Familie:	<i>Peronosporaceae</i>
Gattung:	<i>Pseudoperonospora</i>
Art:	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> [SAVORY et al. 2011]

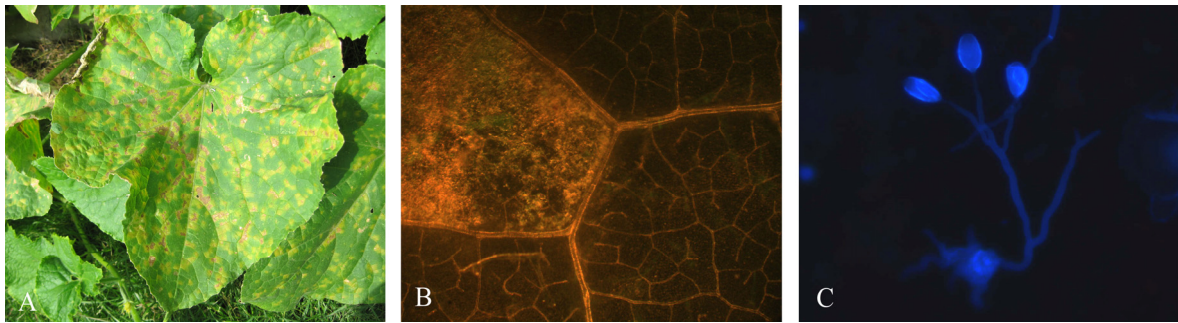


Abb. 1-3: Erscheinungsformen von *P. cubensis* A) Symptome an einem Gurkenblatt im Freiland, B) Myzel in einem Gurkenblatt wachsend eingeschlossen durch Leitgefäße, C) aus Spaltöffnung auswachsender Sporangienträger mit Sporangien.

#### 1.4.2 Bekämpfung von Oomyceten

Die Bekämpfung von pflanzenpathogenen Oomyceten stützt sich im konventionellen Anbau momentan auf den Einsatz von Fungiziden oder auf die Verwendung resistenter Sorten [KAMOUN et al. 1999, SAVORY et al. 2011]. GISI & SIEROTZKI [2008] schätzten, dass im Jahr 2006 weltweit ca. 1,2 Milliarde US \$ für chemisch-synthetische Pflanzenschutzmittel zur Bekämpfung von Oomyceten ausgegeben wurden.

Seit Ende des 19. Jahrhunderts wurden kupferhaltige Präparate als wirksame Mittel gegen Oomyceten verursachte Krankheiten wie den Falschen Mehltau an Weinreben und Hopfen oder gegen Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel eingesetzt [FORSTER 2008]. Sie waren als Kontaktfungizide über Jahrzehnte das einzige Fungizid zur Kontrolle des Falschen Mehltaus an Gurke (*P. cubensis*) [URBAN & LEBEDA 2006]. Während im konventionellen Anbau heute weitgehend mit chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln gearbeitet werden kann, gibt es im ökologischen Landbau bisher noch keine vergleichbaren Alternativen, so dass Landwirte nicht auf Kupferpräparate verzichten können [FORSTER 2008]. Jedoch bleibt die Verwendung von Kupferpräparaten nicht ohne Folgen für die Umwelt. Das ergaben Untersuchungen der Bodenfauna, zu Vögeln, Kleinnagern und aquatischen Habitaten. JÄNSCH & RÖMBKE [2009] folgerten in ihrem Forschungsbericht, dass eine längere Anwendung von kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln zu einer Anreicherung im Boden führt, da es nur zu einer sehr geringen Nutzung des Kupfers als Pflanzenmikronährstoff kommt. Es wurde eine toxische Wirkung auf Bodenorganismen, insbesondere auf Regenwürmer, nachgewiesen. Auch ein negativer Einfluss auf höhere Lebewesen kann nicht ausgeschlossen werden [WILBOIS et al. 2009]. Daher gibt es seit mehr als zehn Jahren auf EU-Ebene und auch national Bestrebungen, auf kupferhaltige Pflanzenschutzmittel ganz zu verzichten. Durch die EU-Verordnung über die ökologische/biologische Produktion von ökologischen/ biologischen Erzeugnissen (EG. Nr.

---

834/ 2007) sind Höchstmengen von 6 kg/ha pro Jahr Reinkupfer für den ökologischen Anbau festgelegt worden [EG. Nr. 834/ 2007]. Privatrechtliche Richtlinien für den Bio-Anbau haben die Höchstmenge noch einmal auf 3 bzw. bei Hopfen auf 4 kg/ha pro Jahr verringert [WILBOIS et al. 2009]. Daher ist es besonders wichtig, nach alternativen Pflanzenschutzmitteln für die Bekämpfung von Oomyceten im ökologischen Anbau zu forschen. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und auch Metaboliten von Mikroorganismen haben, im Hinblick auf das wachsende ökologische Bewusstsein der Verbraucher und Anbieter, ein hohes Potential, die Pflanzenschutzmittel von morgen zu werden.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Oomyceten sind auf Pflanzen schwer zu kontrollieren. *P. cubensis* ist der Erreger des Falschen Mehltaus auf Gurkenpflanzen und hat zum Teil verheerende Auswirkungen auf den Gurkenanbau [URBAN & LEBEDA 2006]. Für den biologischen Pflanzenschutz stehen bisher meist nur Kupferpräparate als wirksame Mittel zur Verfügung. Die Aufwandmengen für kupferhaltige Präparate wurden jedoch durch die Europäische Kommission begrenzt [EG Nr. 473/2002] und sie sollen in der Zukunft möglichst ganz verboten werden [STEPHAN et al. 2005].

Diese Arbeit beschäftigte sich im Rahmen des vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) geförderten Projektes „Strategiekombinationen zur Regulierung des Falschen Mehltaus an Gurken unter Glas/Folie und im Freiland“ mit der Untersuchung der Wirksamkeit eines Bakterienpräparates aus *A. migulanus* gegen den Falschen Mehltau an Gurke (*P. cubensis*). Das Hauptaugenmerk des Projektes lag auf der Entwicklung von in der Praxis anwendbaren Präparaten. Zusätzlich wurde ein Pflanzenextrakt aus Federmohn (*M. cordata*), welcher von der Firma Phytobiotics GmbH bereit gestellt wurde, auf seine Wirkung gegen das Pathogen geprüft. Im Zentrum der eigenen Arbeiten standen *in vitro*-Versuche, Biotests und molekularbiologische Methoden zur Untersuchung der Wirkmechanismen der Bakterienkultur und des Pflanzenextraktes. Anschließend wurde die Möglichkeit einer Wirkungssteigerung durch Kombination bzw. durch Optimierung der Präparate ermittelt.

Die Metabolitenproduktion bei *A. migulanus* im 7 L-Fermenter stellte sich als schwierig heraus. Daher wurde der Einfluss der Fermentation auf die Metabolitenproduktion untersucht sowie die Möglichkeit einer Großproduktion auf festem Medium für Anwendung in der Praxis.

---

Da es in vorangegangenen Arbeiten mit *A. migulanus* zur Aufspaltung in verschiedene Phänotypen kam, sollten die einzelnen Stämme anhand verschiedener Parameter miteinander verglichen werden. Eine Fettsäureanalyse und die phylogenetische Einordnung sollten die Identität der Phänotypen klären.

Mit dem Extrakt aus *M. cordata* wurde unter *in vitro*-Bedingungen und auch *ad planta* die Wirksamkeit gegen weitere Pathogene untersucht. Der Pflanzenextrakt wird in Deutschland als Tierfutterzusatzstoff verwendet wird, ist jedoch als Pflanzenschutzmittel wenig untersucht.

---

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Nährmedien

Alle Medien wurden nach den angegebenen Rezepturen gemischt und anschließend bei 120 °C für 20 min im Autoklaven sterilisiert.

##### 2.1.1.1 Trypton Soja Medium (TSB, TSA)

###### TSB

30 g            Trypton Soja Brühe (Otto Nordwald)  
ad 1000ml    VE-Wasser

###### TSA

30 g            Trypton Soja Brühe (Otto Nordwald)  
17 g            Agar-Agar (INSULA)  
ad 1000ml    VE-Wasser

###### 1/10 TSA

3 g            Trypton Soja Brühe (Otto Nordwald)  
17 g            Agar-Agar (INSULA)  
ad 1000ml    VE-Wasser

##### 2.1.1.2 LB (Lennox) Grundmedium

###### LB-Brühe

20 g            LB (Lennox)  
ad 1000 ml    VE-Wasser

###### LB-Agar

20 g            LB (Lennox)  
ad 1000 ml    VE-Wasser  
17 g            Agar-Agar (INSULA)

---

#### LB ohne Salz für Topagar

0,2 g	Soja Pepton (Roth)
0,1 g	Hefeextrakt (Roth)
0,14 g	Agar-Agar (INSULA)
ad 20 ml	VE-Wasser

#### **2.1.1.3 Gemüsesaft-Agar**

200 ml	Gemüsesaft
3 g	CaCO <sub>3</sub> (Roth)
16 g	Agar Agar (INSULA)
ad 1000ml	VE-Wasser

#### **2.1.1.4 Potato Dextrose Agar (PDA)**

39 g	PDA (Roth)
ad 1000 ml	VE-Wasser

#### **2.1.1.5 Miller-Schroth Medium (MS)**

8 g	Nutrient broth (Otto Nordwald)
50 g	Saccharose (Roth)
9 ml	Brom-Thymol-Blau (0,5 %)
2,5 ml	Neutralrot (0,5 %)
17 g	Agar-Agar (INSULA)
ad 1000 ml	VE-Wasser

Vor dem Autoklavieren den pH Wert auf 7,4 mit 2 M NaOH einstellen.

#### **2.1.2 Puffer und Lösungen**

##### **2.1.2.1 1x TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl (pH 8, Roth)
1 mM EDTA (pH 8, Roth)

---

#### 2.1.2.2 1M TRIS

121,14 g TRIS (Roth)

ad 1000 ml VE-Wasser

#### 2.1.2.3 Tween (0,0125 %)

0,0125 ml Tween 20

ad 100 ml VE-Wasser

Die Lösung wurde nach dem Autoklavieren im Kühlschrank gelagert.

#### 2.1.2.4 physiologische Kochsalzlösung

0,85 g NaCl (Roth)

ad 100 ml VE-Wasser

Weitere Puffer und Lösungen wurden bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

#### 2.1.3 PCR-Primer

Die DNA-Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofin MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Sie wurden in 1x TE-Puffer gelöst und bei -28 °C gelagert. Ihre Konzentration entsprach 100 pmol/μl.



Tab. 2-1: Primersequenzen für A) die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) und B) für die phylogenetische Untersuchung der 16S rRNA verschiedener *A. migulanus* Phänotypen. F indiziert für forward und R für reverse, T<sub>m</sub> gibt die Schmelztemperatur an, \* kennzeichnet Oligonukleotide, die für Sequenzierungsreaktionen verwendet wurden.

A) Primer für quantitative RT-PCR	Sequenz (5'→ 3')	T <sub>m</sub> [°C]	Autor
Actin F	TGGACTCTGGTGATGGTGTTA	57,9	Xia et al. 2009
Actin R	CAATGAGGGGATGGCTGGAAAA	57,9	Xia et al. 2009
GST-F	TTTGAGGAGGTGAAGGTAA	52,4	Xia et al. 2009
GST-R	ACGCACAAGAAATGTAGAT	50,2	Xia et al. 2009
POD-F	AGCAGCAGTTGAGAGTGCTT	57,3	Xia et al. 2009
POD-R	CTCCTGATAGAGCCACGAGA	59,4	Xia et al. 2009
PR1-F	TGAGTGGACAAAACAGTAGC	57,9	Xia et al. 2009
PR1-R	CATCCACCCACAACCTGAACT	57,3	Xia et al. 2009
<b>B) Primer für 16S rRNA</b>			
fD1	TGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	60,6	Weisburg et al. 1991
rP2	CCTACGGCTACCTTGTACGACTT	62,7	Weisburg et al. 1991
522f *	CTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC	65,8	Leclerque nicht publiziert
760r *	CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGC	60,6	Leclerque nicht publiziert

## 2.1.4 Bakterien- und Pilzstämmen

### 2.1.4.1 *Aneurinibacillus migulanus*

Der ursprüngliche Stamm von *A. migulanus* stammte aus der Stammhaltung in Schottland und ist dort als NCIMB 7096 hinterlegt. Er wird in dieser Arbeit als der Wildtyp (WT) geführt. Der Stamm *A. migulanus* E1 wurde von der Arbeitsgruppe von B. Seddon der Universität in Aberdeen zur Verfügung gestellt.

Die weiteren *A. migulanus*-Stämme dieser Arbeit stammen aus der Kultivierung im JKI Darmstadt.

### 2.1.4.2 *Micrococcus luteus*

*M. luteus* stand in der JKI Stammhaltung zur Verfügung. Er hat dort die Bezeichnung 20030.

---

#### 2.1.4.3 *Erwinia amylovora*

*E. amylovora* stammte aus dem Feuerbrandversuch 2008 und wurde dem Institut von Frau Dr. Moltmann vom LTZ Augustenberg zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.4.4 *Clavibacter michiganensis*

*C. michiganensis* wird im JKI Darmstadt unter der Bezeichnung „GSPB“ geführt.

#### 2.1.4.5 *Pseudoperonospora cubensis*

*P. cubensis* wurde als biotropher Pilz im JKI Darmstadt auf Gurkenpflanzen erhalten. Er wurde ursprünglich von Freilandgurken isoliert.

#### 2.1.4.6 *Phytophthora infestans*

*P. infestans* stammte aus der Stammhaltung des JKI in Darmstadt und wird dort unter „P. infestans 422010“ geführt.

#### 2.1.4.7 *Podosphaera xanthii*

*P. xanthii* muss als biotropher Pilz auf Gurkenpflanzen erhalten werden. Er wurde von Freilandgurken isoliert.

#### 2.1.4.8 *Botrytis cinerea*

*B. cinerea* wird in der JKI-eigenen Stammhaltung unter „B.c. 62084“ geführt.

#### 2.1.4.9 *Fusarium graminearum*

*F. graminearum* wurde in der Stammhaltung des JKI als „Fus. gram.“ aufbewahrt.

---

### 2.1.5 Pflanzenmaterial

#### 2.1.5.1 *Cucumis sativus*

Für die Versuche wurden Gurkenpflanzen, *Cucumis sativus* L. der Sorte „Chinesische Schlange“ verwendet. Hierbei handelt es sich um eine für den Falschen Mehltau (*Pseudoperonospora cubensis*) anfällige Sorte. Das Saatgut wurde von der Firma HILD bezogen.

#### 2.1.5.2 *Macleaya cordata*

Das Pflanzenmaterial von Federmohn (*Macleaya cordata*) wurde von der Firma Phytocare in Eltville verarbeitet und für die Versuche in Form eines Pulvers zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.5.3 *Daucus carota*

Befallenes Möhrensaatgut stammte noch von den Versuchen zum EU-Projekt STOVE (2003-2006, siehe STOVE) und wurde von der Firma HILD zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Versuchspflanzen wurden in KKS Bio-Potgrond, gemischt mit Quarzsand in einem Verhältnis 1:4 (1 Teil Quarzsand, 3 Teile Erde), ausgesät und weiter kultiviert.

Hier wurden jeweils zwölf Samen in mit Erde gefüllte kleine Plastiktöpfe (8 x 8 x 8,5 cm) ausgesät und mit einer dünnen Schicht Vermiculit bedeckt. Die Pflanzen wurden in einem Klimaraum bei ca. 20 °C für drei bis vier Tage unter einer Plastikhaube angezogen bis Keimlinge sichtbar wurden. Dann wurde die Haube entfernt. Etwa eine Woche nach der Aussaat wurden die Pflanzen in Plastiktöpfe (8 x 8 x 8,5 cm) pikiert und anschließend bis zum Versuchsbeginn in einem Anzuchttraum bei 20 – 22 °C herangezogen. Sie wurden eine Woche nach dem Pikieren mit AminoVital (Biofa) gedüngt und standen während der gesamten Anzucht unter künstlicher Beleuchtung (Osram L30W/ 77). Die Belichtungsdauer betrug 16 h. Die Versuche mit den Pflanzen fanden in einem zweiten Klimaraum statt.

---

## 2.2.2 Dauerkultur der Mikroorganismen und Inokulumgewinnung

### 2.2.2.1 *Aneurinibacillus migulanus*

*A. migulanus* wurde auf 1/10 TSA kultiviert. Dazu wurde etwa alle vier Wochen eine Kolonie mit einer sterilen Impföse auf neue TSA-Platten überimpft. Diese Platten wurden anschließend für zwei Tage bei 37 °C bebrütet und dann entweder bei Raumtemperatur oder für einen längeren Zeitraum bei 4 °C aufbewahrt. Das weitere Vorgehen ist unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben.

### 2.2.2.2 *Micrococcus luteus*

*M. luteus* wurde auf LB-Medium in Dauerkultur gehalten. Dazu wurde etwa alle zwei Monate unter sterilen Bedingungen ein frischer Ausstrich auf LB-Medium durchgeführt. Die Kultur wurde anschließend zwei Tage bei 30 °C inkubiert und danach bei Raumtemperatur gelagert. Für die Bestimmung des Gramicidingehaltes wurden mit einer Kolonie von *M. luteus* 60 ml LB-Medium (flüssig) unter sterilen Bedingungen beimpft und zwei Tage bei 30 °C bei 150 rpm kultiviert. Die entstandene Kulturbrühe wurde dann photometrisch auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 1 und 0,8 eingestellt. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde dann direkt für die Vorbereitung eines Hemmhoftests verwendet oder sie wurde bei -20 °C eingefroren über mehrere Monate gelagert.

### 2.2.2.3 *Erwinia amylovora*

Der Erreger des Feuerbrandes *E. amylovora* wurde auf Miller-Schroth Medium kultiviert. Dafür wurde etwa alle 2 Wochen ein Verdünnungsausstrich unter sterilen Bedingungen auf einer frischen Platte angesetzt und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Da *E. amylovora* sehr stark wächst, wurde das Pathogen für die Versuche direkt von den Platten in Flüssigkeit aufgenommen und verwendet.

---

#### 2.2.2.4 *Clavibacter michiganensis*

*C. michiganensis* wuchs auf PDA. Das Bakterium wurde etwa alle 2 Wochen unter sterilen Bedingungen auf eine frische Platte überimpft und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Für die Versuche wurde es direkt mit sterilem Wasser von der Platte herunter gewaschen und verwendet.

#### 2.2.2.5 *Pseudoperonospora cubensis*

*P. cubensis* wurde als obligat biotropher Pilz auf Gurkenpflanzen erhalten. Dazu wurden befallene Pflanzen bei 20 °C für etwa 24 Stunden unter einer Plastikhaube feucht und dunkel gehalten, um Sporangienträger auszubilden. Die Sporangien wurden dann in VE-Wasser von den Blättern abgewaschen und mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Nach dem Einstellen auf die gewünschte Konzentration konnten neue Gurkenpflanzen inokuliert werden. Diese wurden mit dem Inokulum auf der Blattunterseite eingesprüht bis sich deutliche Tropfen bildeten. Anschließend wurden die Pflanzen unter einer Plastikhaube bei ca. 20 °C für ca. 24 Stunden wiederum feucht und dunkel gestellt. Danach wurde die Plastikhaube abgenommen.

Die ersten Symptome des falschen Mehltaus waren nach wenigen Tagen sichtbar; bis zu einem deutlichen Befall dauerte es ca. acht bis zwölf Tage. Neue Sporangien konnten schon von etwa zehn Tagen befallenen Pflanzen gewonnen werden.

#### 2.2.2.6 *Phytophthora infestans*

*P. infestans* wurde auf Gemüsesaft-Agar in Dauerkultur gehalten. Hierfür wurde etwa alle zwei bis drei Wochen ein kleiner Agarblock aus der Ausgangsplatte herausgeschnitten und steril auf eine neue Agarplatte überführt oder es wurde alternativ mit einer ausgeglühten Impfnadel ein wenig Myzel abgenommen und auf einer frischen Platte abgestreift. Der Pilz wurde bei ca. 17 °C in Dunkelheit inkubiert. Es dauerte etwa zwei Wochen bis der Pilz das Nährmedium vollständig überwachsen hatte.

Für den Versuch zur Hemmung des Myzelwachstums wurden unter sterilen Bedingungen Myzelstücke aus einer bewachsenen Agarplatte herausgeschnitten und auf neuem Nährmedium ausgelegt.

Um Sporangien und Zoosporen zu gewinnen, wurden von einer etwa zwei Wochen alten Platte mit ca. 5 ml (sterilem) VE-Wasser Sporangien abgewaschen. Die Sporangiensuspension

---

wurde nachfolgend durch ein Fließ gefiltert, um Myzelreste abzutrennen. Für optimale Sporulationsbedingungen benötigt *P. infestans* niedrige Temperaturen und daher wurde der Pilz für mind. zwei Stunden im Kühlschrank bei 8 °C inkubiert.

Um den Pilz infektiös zu erhalten, wurde er in unregelmäßigen Abständen ca. alle 3 Monate über Kartoffelknollen passagiert wie bei ROHDE [2003] beschrieben. Dazu wurde an der Kartoffel anhaftender Schmutz mit Spülmittel abgewaschen und mehrere Minuten unter fließendem Wasser gespült. Anschließend wurde die Kartoffel in 70 %igen Alkohol getaucht, abgeflammt und auf einem sauberen Tuch abgelegt. Die Knolle wurde dann mit einem sterilen Messer in etwa 1 cm breite Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden auf einem Gitterrost mit Handtuchpapier in eine Gerda-Schale gelegt und suberinisieren gelassen. Anschließend wurde von einer Agarplatte ein Stück Myzel herausgeschnitten und auf die Scheiben aufgelegt. Nach zwei Tagen wurde die Kartoffelscheibe umgedreht, damit sie vom Pilzmycel durchwachsen werden konnte. Frisches Myzel wurde anschließend unter sterilen Bedingungen auf eine neue Gemüsesaft-Agarplatte überführt.

#### 2.2.2.7 *Podosphaera xanthii*

Der Echte Gurken-Mehltau (*P. xanthii*) muss als obligat biotropher Pilz auf lebenden Pflanzen erhalten werden. Dazu wurden Konidien von befallenen Pflanzen über nicht befallenen Gurkenpflanzen abgeschüttelt.

Für die Gewinnung des Inokulums wurden einen Tag vor der Inokulation die alten Konidien von befallenen Pflanzen abgeschüttelt. Die am darauf folgenden Tag neu gebildeten Konidien wurden in 0,0125 %iger Tween 20-Lösung aufgenommen, mikroskopisch ausgezählt und auf  $1 \cdot 10^4$  Sporen/ml eingestellt.

#### 2.2.2.8 *Alternaria dauci* und *A. radicina*

Für die Versuche im System *Alternaria* - Möhre wurde Saatgut von *Daucus carota* L. ssp. *sativus* der Firma HILD genutzt, welches bereits zu einem hohen Grad natürlich mit *A. dauci* und *A. radicina* belastet war. Das Saatgut wurde seit 2003 bis zur Anwendung bei 8 °C im Kühlschrank gelagert.

---

#### 2.2.2.9 *Botrytis cinerea*

*B. cinerea* wuchs auf PDA-Medium. Der Pilz wurde etwa alle vier Wochen neu überimpft und bei 25 °C inkubiert. Er wuchs sehr schnell und hatte nach etwa einer Woche das Nährmedium vollständig überwachsen.

Für den Versuch wurden unter sterilen Bedingungen Myzelstücke aus dem Medium herausgeschnitten und auf frisches Medium aufgelegt.

#### 2.2.2.10 *Fusarium graminearum*

Der Pilz *F. graminearum* wurde ebenfalls auf PDA-Medium kultiviert und etwa alle vier Wochen auf frisches Medium überführt. Er wuchs bei Raumtemperatur und benötigte etwa zwei Wochen, um das Medium vollständig zu überwachsen.

Zur Untersuchung des Einflusses der Präparate auf das Wachstum wurden Myzelstücke aus überwachsenem Medium herausgeschnitten und auf frisches Medium aufgelegt.

### 2.2.3 Präparatgewinnung

#### 2.2.3.1 Extraktgewinnung aus *Macleaya cordata*

Der pulverförmige Pflanzenextrakt aus *Macleaya cordata* wurde uns freundlicherweise von der Firma Phytobiotics GmbH [65343 Eltville, Deutschland, [www.phytobiotics.com](http://www.phytobiotics.com)] zur Verfügung gestellt.

Dort wurden die Früchte von *Macleaya cordata* 20 h bei 50 bis 60 °C in reinem Ethanol bei einem Druck von 0,2 Mpa extrahiert. Anschließend wurde der so gewonnene Rohextrakt mittels Vakuum-Filter aufkonzentriert. In einem Absorptions-Tower wurden die wasserlöslichen Substanzen ausgewaschen und die Alkaloide in reinem Ethanol aufgenommen. Die Alkaloidlösung wurde dann durch einen micro-pore Filter gefiltert und erneut bis auf einen gewünschten Sanguinarin- und Chelerythringehalt aufkonzentriert. Dies geschah bei Temperaturen von 50 bis 60 °C. In einem letzten Schritt wurde die Lösung in einem Sprüh-Trockner getrocknet und lag dann in Pulverform vor. Nach Angaben des Herstellers hat der gewonnene Extrakt einen Sanguiningehalt von durchschnittlich 60 % [persönliche Mitteilung Gehrke, 2011].

---

### 2.2.3.2 Gewinnung der Bakterienkulturbrühe

#### Herstellung der Starterkultur

Bei allen Versuchen mit *A. migulanus* wurde eine 60 ml Starterkultur in TSB Medium angesetzt. Dazu wurden je 60 ml steriles TSB-Medium in 200 ml-Erlenmeyerkolben mit einer Kolonie von *A. migulanus* beimpft und zwischen 12 und 16 h bei 37 °C und 150 rpm auf einem Schüttler inkubiert.

#### Kultivierung in flüssigem Medium (TSB)

Es wurden je 200 ml TSB-Medium für 1 L-Kolben und je 400 ml für 2 L-Kolben angesetzt und autoklaviert. Dieses Medium wurde dann mit der Starterkultur (1 % des Volumens) beimpft. Die Ansätze wurden dann ein bis fünf Tage bei 37 °C und 150 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die fertigen Kulturen wurden bis zur Verwendung steril bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

#### Kultivierung auf Festmedium (TSA)

Hierfür wurden je 500 ml TSA angesetzt und autoklaviert. Dieses Medium wurde dann in sterile Blechplatten [BLANCO 550064] gegossen und fest werden gelassen. Auf das feste Medium wurden dann je 3 ml der Starterkultur ausplattiert und mit einem sterilen Deckel abgedeckt. Die Platten wurden fünf Tage bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde der gewachsene Bakterienrasen steril mit einem Schaber abgenommen, in 100 ml sterilem Wasser pro Platte aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Ansätze noch einmal 4fach VE-Wasser verdünnt.

#### Kultivierung im Fermenter

Die Produktionen im 7 L-Fermenter wurden von der Firma bio-ferm (früher BioProtect, 78467 Konstanz) durchgeführt. Im Versuchszeitraum wurden verschiedene Kultivierungsfaktoren verändert (z.B. Rührergeschwindigkeit, Sauerstoffzufuhr) und auf ihren Einfluss auf die Kultur von *A. migulanus* untersucht.



---

## 2.2.4 Biotests mit Falschem Mehltau (*Pseudoperonospora cubensis*)

### 2.2.4.1 Biotests allgemein

Für die Biotests an Gurken wurden jeweils sechs bis acht Pflanzen pro Variante verwendet. Für die meisten Versuche wurden die Pflanzen bis auf die ersten beiden Blätter ausgegeizt. Die Pflanzen wurden je nach Versuchsaufbau auf einer oder auf beiden Blattseiten mit den Präparaten in verschiedenen Konzentrationen mit Hilfe eines Glassprühers (Desaga), der an eine Vakuumpumpe (Neubauer) angeschlossen wurde, tropfnass eingesprüht.

Einen Tag nach der Applikation der Präparate wurden die Pflanzen nach SCHUSTER & Von LOCHOW [1978] randomisiert aufgestellt und anschließend mit Falschem Mehltau (*P. cubensis*) inokuliert. Dazu wurden von befallenen und über Nacht feucht gestellten Pflanzen die Sporangien mit VE-Wasser abgewaschen und auf  $1 \cdot 10^4$  Sporangien/ ml eingestellt. Diese Suspension wurde dann mit einem Glassprüher auf die Blattunterseite der Pflanzen appliziert. Die Pflanzen wurden über Nacht unter einer mit dunkler Folie abgedeckten und befeuchteten Plastikhaube bei ca. 22 °C feucht und dunkel gestellt. Nach etwa 24 h wurde die Plastikhaube entfernt. Die Bonitur des Befalls fand 10 bis 14 Tagen nach Inokulation statt. Die Befallsstärke pro Blatt wurde durch visuelle Abschätzung in 5 %-Schritten ermittelt.

Für alle nachfolgend aufgeführten Biotests gilt grundsätzlich der hier aufgeführte Versuchsaufbau, wenn nicht anders beschrieben.

### 2.2.4.2 Kurative Wirkung

Um die kurative Wirkung zu untersuchen, wurden Pflanzen einen Tag vor oder einen, drei oder fünf Tage nach Inokulation mit dem Pathogen *P. cubensis* mit den Präparaten behandelt. Die Präparate waren in diesem Versuch der Extrakt aus *M. cordata* (50 µg/ml) und eine fünf Tage alte Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß (1:1 verdünnt).

### 2.2.4.3 Translaminare Wirkung

Um zu untersuchen, ob eine Verlagerung der Präparate oder der Wirkung über das Blatt stattfindet, wurden die Präparate auf unterschiedliche Teile der Gurkenblätter aufgebracht. Die Blätter wurden entweder auf der gesamten Oberseite oder Unterseite eingesprüht. Ein weiterer Teil der Pflanzen wurde nur auf der rechten Blattunterseite getrennt durch die Mittelrippe mit dem Pflanzenextrakt (50 µg/ml) oder einer Flüssigkultur von *A. migulanus*

---

weiß (1:1 verdünnt) behandelt. *P. cubensis* wurde am darauffolgenden Tag auf die gesamte Blattunterseite der Pflanzen aufgebracht.

#### **2.2.4.4 Wirkung einzelner Bestandteile von *A. migulanus***

In diesem Versuch wurden fünf Tage alte Flüssigkulturen von *A. migulanus* weiß bei 10000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen wurden mit VE-Wasser gewaschen und nach nochmaliger Zentrifugation und Entfernung des Überstandes mit VE-Wasser auf das Ursprungsvolumen aufgefüllt.

Die Gesamtkultur, der Überstand und die gewaschenen Zellen wurden 1:1 verdünnt auf die Blattunter- oder Blattoberseite der Pflanzen einen Tag vor Inokulation aufgesprüht.

#### **2.2.4.5 Einfluss des Abtrocknungseffektes auf den Befall**

In diesem Versuch wurde überprüft, ob die Abtrocknung der Pflanzen einen Einfluss auf den Befall mit *P. cubensis* hat. Hierfür wurden fünf Tage alte Flüssigkulturen von *A. migulanus* weiß und *A. migulanus* E1 wie in 2.2.4.4 beschrieben vorbereitet. Gurkenpflanzen wurden mit den 1:1 verdünnten Präparaten auf den Blattunterseiten tropfnass eingesprüht und über Nacht abtrocknen gelassen. Am darauffolgenden Tag wurden alle Pflanzen auf der Blattunterseite mit *P. cubensis* inokuliert. Ein Teil der Pflanzen wurde dann sofort dunkel und feucht gestellt, alle weiteren Varianten erst 30 – 210 min nach der Inokulation.

#### **2.2.5 Biotests mit Echtem Mehltau (*Podosphaera xanthii*)**

Gurkenpflanzen wurden auf beiden Blattseiten mit dem Pflanzenextrakt aus *M. cordata* (10 – 100 µg/ml) behandelt und über Nacht abtrocknen gelassen. Als Kontrolle wurde Milsana® (1%) eingesetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Pflanzen gleichmäßig mit dem Erreger des Echten Mehltaus auf der Blattoberseite inokuliert. Sie wurden dann bis zur Bonitur für zehn bis zwölf Tage im Gewächshaus bei natürlichen Tageslichtbedingungen aufgestellt. Die Auswertung erfolgte durch eine visuelle Abschätzung der Befallsstärke in 5 %-Schritten.

---

### 2.2.6 Wirkung des *M. cordata*-Extraktes auf *A. dauci* und *A. radicina* an Möhren

Für diesen Versuch wurden je 300 Samen pro Variante von *Daucus carota* (HILD) verwendet (1000 Korn Gewicht etwa 1 g). Dieses Saatgut hatte einen natürlichen und starken Befall mit *Alternaria dauci* und *A. radicina*. Die Samen wurden in ein kleines Becherglas gegeben und mit 20 ml der Pflanzenextraktlösung bedeckt 30 min langsam gerührt. Der Extrakt aus *M. cordata* wurde in den Konzentrationen 100 µg/ml und 1000 µg/ml verwendet. VE-Wasser diente als Negativkontrolle. Die Lösungen wurden anschließend abgegossen und die Samen über Nacht auf einem Handtuchpapier abtrocknen gelassen. Das mit Thiram (1 %) gebeizte Saatgut war schon vorrätig und diente als Kontrolle.

Es wurden je drei Schalen (Tontarelli 28 x 18 x 6 cm) pro Variante mit je 1,5 l Erde (P-Typ der Firma Fruhstorfer) gefüllt. Anschließend wurden jeweils 500 ml Leitungswasser gleichmäßig darüber verteilt. Je 100 Möhrensamen wurden dann, unter zu Hilfenahme einer Schablone mit 100 Löchern, in die vorbereiteten Schalen ausgesät. Zum Schluss wurden 400 ml Vermiculit zum Abdecken der Samen gleichmäßig in der Schale verteilt und mit Wasser angefeuchtet. Die Schalen wurden eine Woche mit geschlossenem Deckel in einen Klimaraum mit 23 °C gestellt bis sich die ersten Pflänzchen zeigten. Danach wurden die Deckel entfernt und die Pflanzen zwei weitere Wochen herangezogen. Nach 19 Tagen wurde der Versuch ausgewertet. Es wurden alle aufgelaufenen Pflanzen gezählt und in erkrankte und gesunde Pflanzen unterteilt.

### 2.2.7 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Nachweis mittels DAB-Färbung

Mit Hilfe von DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) kann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> histologisch nachgewiesen werden. Die hier verwendete Methode ist an THORDAL-CHRISTENSEN et al. [1997] und an die Arbeit von MÜLLER [2002] angelehnt.

#### 2.2.7.1 Nachweis in Blattscheiben

Es wurden pro Variante zehn Blattscheiben aus zehn Sekundärblättern von drei Wochen alten Gurken mit einem Korkbohrer (Ø 2,0 cm) ausgestantzt. Die Blattscheiben wurden anschließend für 2 h in 5 ml 10 mM MES-Puffer inkubiert, um den Verwundungseffekt in den Blättern abklingen zu lassen. Sie wurden mit VE-Wasser abgespült und in jeweils 5 ml der zu testenden Lösung gegeben. Diese Lösungen wurden unterschiedlich lange (von 10 min bis 24

---

h) einwirken gelassen. Nachdem die Lösungen abgegossen worden waren, wurden die Blattscheiben erneut mit VE-Wasser gespült. Danach wurden jeweils 5 ml 0,1 % DAB (pH 3,8) zugegeben und die Blattscheiben wurden 3 h im Licht (Klimaraum) bei ca. 20 °C inkubiert. Für den Chlorophyllentzug wurden sie 48 h in Entfärbelösung eingelegt, wobei die Lösung nach 24 h einmal ausgetauscht wurde. Die Blattscheiben wurden anschließend in 70 % Glycerin aufbewahrt.

#### 2.2.7.2 Nachweis in ganzen Pflanzen

Hierfür wurden je zwei Pflanzen pro Variante auf der Ober- und Unterseite der Blätter mit den zu testenden Präparaten eingesprüht. Nach 10 min wurden aus den ersten zwei Pflanzen zehn Blattscheiben mit einem Korkbohrer (Ø 2,0 cm) ausgestanzt und sofort in DAB eingelegt. Die nächsten Blattscheiben wurden nach 3 h und nach 24 h aus neuen Pflanzen ausgestanzt. DAB wurde 3 h einwirken gelassen und anschließend wurden die Blattscheiben wie in 2.2.4.1.1 beschrieben, entfärbt und gelagert.

##### 1M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer (MES-Puffer)

1,952 g	MES (Roth)
1000 ml	VE-Wasser

##### DAB-Lösung

0,1 g	DAB (Roth)
ad 100 ml	VE-Wasser (pH 3,8)

##### Entfärbelösung

80 ml	Ethanol (100 %)
20 ml	Chloroform (Roth)
0,15 g	Trichloressigsäure (Roth)

##### Fixierungslösung

70 ml	Glycerin (Roth)
30 ml	VE-Wasser

---

### 2.2.8 Prüfung auf phytotoxische Wirkung der Präparate

Um die mögliche phytotoxische Wirkung der Präparate auf Blattscheiben von drei Wochen alten Gurkenpflanzen zu untersuchen, wurden mit einem Korkbohrer ( $\varnothing$  2,0 cm) Blattscheiben ausgestanzt und für 10 min oder vier Stunden in den einzelnen Lösungen inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie mit der Blattunterseite nach oben auf Wasseragar ausgelegt und nach einem und zwei Tagen begutachtet. Als Kontrolle dienten Blattscheiben, welche aus Pflanzen ausgestanzt wurden, die einen Tag zuvor mit den Präparaten besprüht worden waren. Die getesteten Präparate waren der *M. cordata*-Extrakt (50 µg/ml), eine Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß Gesamtkultur, Überstand, Zellen (1:1 verdünnt), reines Gramicidin S (100 µg/ml) und VE-Wasser.

### 2.2.9 Wirkung der Präparate auf Oomyceten

#### 2.2.9.1 Einfluss auf den Zoosporenschlupf von *P. infestans*

Einen Hinweis auf eine direkte Wirkung der Agenzien kann der Zoosporenschlupf bieten. Die Untersuchungen wurden an Sporangien von *Phytophthora infestans* durchgeführt.

Die Sporangien von *P. infestans* wurden von Agarplatten abgespült und in Erlenmeyerkolben aufgenommen. Danach wurden die Sporangiensuspension mit den zu testenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen gemischt. Die Kolben wurden während des Versuchs im Kühlschrank aufbewahrt, um optimale Schlupfbedingungen zu schaffen. Stündlich wurde über drei bis sieben Stunden eine Probe genommen und 3 x 100 Sporangien unter dem Mikroskop ausgezählt und in entleert und nicht entleert unterteilt.

#### 2.2.9.2 Einfluss der Präparate auf Zoosporen von *P. infestans*

Eine Sporangiensuspension von *P. infestans* wurde für ca. zwei Stunden in den Kühlschrank gestellt bis ausreichend viele Zoosporen geschlüpft waren. Anschließend wurde ein Tropfen dieser Suspension auf einen Objektträger gegeben und ein Deckglas darauf gelegt. Unter dem Mikroskop wurden die Zoosporen auf ihre Vitalität überprüft. Dann wurde vom Rand des Deckglases aus das Präparat dazu pipettiert und die Wirkung auf die Zoosporen beobachtet. Die zu testenden Präparate waren der Pflanzenextrakt (50 µg/ml), eine Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß als Gesamtkultur, Überstand und Zellen (jeweils 1:1 verdünnt), reines Gramicidin S (100 µg/ml) und TSB-Medium.

---

### 2.2.9.3 Keimungstest von *P. cubensis* auf Blattscheiben

Mit Hilfe einer 0,1 %igen Blankophorlösung können Sporangien und Zoosporen auf Blattmaterial fluorezenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Blankophor® fluoresziert blau-violett bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 395 - 440 nm.

Für diesen Versuch wurden Gurkenpflanzen auf der Blattunterseite mit den Präparaten behandelt und über Nacht abtrocknen gelassen. Am darauffolgenden Tag wurden mit einem Korkbohrer Blattscheiben ausgestanzt (Ø 2,0 cm) und mit der Blattunterseite nach oben auf Wasseragar ausgelegt. Anschließend wurde jeweils ein Tropfen Inokulum (20 µl) auf die Blattscheiben aufgetropft. Die Gefäße mit den Blattscheiben wurden über Nacht abgedeckt im Klimaraum bei 20 °C aufgestellt. Für die Gewinnung des Inokulums wurden Sporangien von *P. cubensis* von befallenen Pflanzen abgewaschen und durch kurzes Zentrifugieren der Suspension bei 800 rpm aufkonzentriert.

Nach einem Tag wurden Blattscheiben für das Mikroskopieren vorbereitet. Zunächst wurde der Tropfen des Inokulums mit einem Handtuchpapier abgesaugt. Anschließend wurde Blankophor® auf die Mitte der Blattscheibe, wo die Sporangien am Vortag aufgetragen worden waren, aufgetropft und 5 min einwirken gelassen. Der Tropfen wurde mit einem Papier abgenommen und es wurde zweimal mit Leitungswasser gespült.

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte an einem Aristoplan Mikroskop (Leica). Die fotografische Dokumentation wurde mit einer Digitalkamera von Olympus und dem analySIS Programm durchgeführt.

#### Färbelösung

0,1 g	Blankophor®
100 ml	Tris/ HCl-Puffer (0,1 M, pH 9,0)

### 2.2.10 Analytische Methoden

#### 2.2.10.1 Massenspektrometrie

Um zu untersuchen, ob *A. migulanus* größere Mengen Gramicidin S in das umgebende Medium abgibt, wurde am JKI für Ökologische Chemie, Analytik und Vorratsschutz in Quedlinburg durch Herrn Dr. Schütze eine semiquantitative Massenspektrometrie mit dem Esquire 3000 (Bruker Daltonik GmbH) durchgeführt. Es handelt sich um ein Inonenfallen Massenspektrometer, welches mit einer APCI Quelle ausgestattet ist.

---

Für die Herstellung der zu untersuchenden Proben wurde aus einer fünf Tage alten Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß eine Gramacidinextraktion durchgeführt, wie in 2.2.5.1 beschrieben. Zusätzlich wurde abzentrifugierter Überstand von *A. migulanus* weiß und E1 zur Untersuchung eingeschickt.

#### **2.2.10.2 Fettsäureanalytik**

Die Fettsäurebestimmung der einzelnen Stämme von *A. migulanus* wurde von Herrn Dr. Felgentreu am JKI für Ökologische Chemie, Analytik und Vorratsschutz in Berlin durchgeführt. Insgesamt wurden sechs Stämme von *A. migulanus* auf TSA untersucht. Die Fettsäurebestimmung wurde mit dem Sherlock® Microbial ID System (MIS) durchgeführt [www.midi-inc.com].

#### **2.2.11 Mikrobielle Methoden**

##### **2.2.11.1 Zellzahlbestimmung**

Um den Anteil an vegetativen Zellen und Sporen in der Bakteriensuspension zu ermitteln, wurden Zellzahlbestimmungen auf TSA-Platten durchgeführt. Hierzu wurden die Bakteriensuspensionen mit steriler NaCl-Lösung (0,85 %) verschieden stark verdünnt ( $1 \cdot 10^{-1}$  –  $1 \cdot 10^{-6}$ ) und jeweils 100 µl auf einer Agarplatte ausplattiert. Es wurden jeweils drei Platten pro Variante und Verdünnungsstufe hergestellt. Nach dem Ausplattieren wurden die Reaktionsgefäße bei 80 °C für 15 min in ein Wasserbad gestellt, um die vegetativen Zellen abzutöten und die Sporen in der Kultur zu erfassen. Auch hier wurden wiederum 100 µl auf eine Platte ausplattiert. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C im Brutschrank für zwei Tage inkubiert. Die Anzahl der Zellen wurde durch das Auszählen der auf dem Agar gewachsenen Kolonien bestimmt.

##### **2.2.11.2 Radialwachstumstest mit Pilzen**

Um die Wirkung der Präparate auf das Myzelwachstum verschiedener Pilze zu überprüfen, wurde ein Radialwachstumstest durchgeführt. Dafür wurden zunächst Stammlösungen des Extraktes aus *M. cordata* und von reinem *Gramicidin S* hergestellt (je 1000 µg/ml) und steril filtriert. Diese wurden dann in flüssiges, ca. 50 °C heißes Nährmedium eingearbeitet, so dass

---

Endkonzentrationen von 10 – 100 µg/ml erreicht wurden. Jeweils 15 ml des Mediums wurden in eine Petrischale gegossen. Nachdem das Medium fest geworden war, wurde ein Agarstück mit Pilzmyzel unter sterilen Bedingungen in die Mitte des Nährmediums aufgelegt und die Platten bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Das Wachstum wurde durch das Ausmessen der Wachstumsradien der Pilze erfasst. Pro Variante wurden vier Petrischalen verwendet.

#### 2.2.11.3 Agardiffusionstest mit Bakterien

Die Versuche wurden mit den phytopathogenen Bakterien *E. amylovora* und *C. michiganensis* sowie dem Gramicidinproduzenten *A. migulanus* durchgeführt. Die Bakterien wurden mit etwa 2 - 4 ml sterilem VE-Wasser von den Anzuchtplatten abgewaschen und auf eine OD<sub>660</sub> von 0,02 – 0,06 eingestellt. Von diesen Suspensionen wurden dann je 100 µl auf je drei Platten pro Variante ausplattiert. Mit einem Korkbohrer (Ø 0,7 cm) wurden anschließend sechs Löcher pro Platte in den Agar gestanzt (siehe Abb. 2-1). In diese Löcher wurden dann je 50 µl der Testlösungen pipettiert. Die Testlösungen waren der *M. cordata*-Extrakt (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 mg/ml), VE-Wasser oder Streptomycinsulfat (0,1 %). Sie wurden alle mit sterilem VE-Wasser angesetzt. Die Platten wurden dann bei den optimalen Temperaturen der Bakterien inkubiert. Nach zwei Tagen wurde durch das Ausmessen der Hemmhöfe um die Stanzlöcher herum der Versuch ausgewertet.

#### 2.2.12 Nachweis und Bestimmung von Gramicidin S

##### 2.2.12.1 Gramicidinextraktion für die Hemmhoftests

Für die Gramicidinbestimmung mittels Hemmhoftest wurden 10 ml einer Bakterienkultur in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Roth) gegeben. Nach Zugaben von 1 ml HCl (0,2 N) wurden die Proben gut gemischt und dann 15 min bei 80 °C in einem Wasserbad erhitzt. Um die Proben abzukühlen, wurden sie anschließend für 15 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 9 ml Ethanol (98 %) wurden die Proben für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler leicht geschüttelt (ca. 150 rpm). Danach wurden die Zellen 15 min bei 10000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Für den Hemmhoftest wurden die Proben steril filtriert (Porengröße 0,45 µm, Roth) und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt.



### 2.2.12.2 Hemmhofest

Im Hemmhofest wurde *Micrococcus luteus* als Testorganismus eingesetzt, da er durch seine gelbe Pigmentierung gut abzugrenzen ist.

Jeweils 1 ml der Bakteriensuspension wurde mit 20 ml LB-Topagar, der auf 50 °C abgekühlt wurde, vermischt und je 3 ml davon wurden auf eine LB Agarplatte verteilt.

Von den zuvor extrahierten Gramicidinlösungen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:1, 1:5, 1:10, 1:100, unverdünnt). In diese Lösungen wurden sterile Antibiotikablättchen (Ø 0,9 cm, Roth) eingetaucht und auf der Agarplatte verteilt (Abb.2-1). Es wurden je drei Platten pro Variante hergestellt. Diese Platten wurden für zwei Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Der Gramicidingehalt wurde durch das Ausmessen der gebildeten Hemmhöfe ermittelt und mit einer Standardgerade abgeglichen. Für die Standardgerade wurde eine Lösung aus reinem Gramicidin S (Sigma) in den Konzentrationen 500, 250, 100, 50 und 25 µg/ml verwendet.

Der Gramicidingehalt wurde mit folgender Gleichung errechnet:

$$x = (y+n)/m$$

y = Hemmhof in mm<sup>2</sup>

x = log der Gramicidin S Konzentration in µg/ml

m = Steigung der Standardgerade

n = y-Achsenschnittpunkt der Standardgeraden

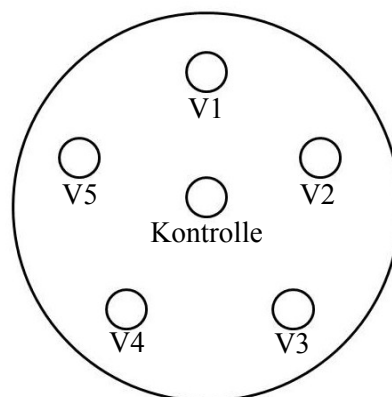


Abb. 2-1: Anordnung der Testsubstanzen in der Petrischale im Hemmhofest, V = Testsubstanz in verschiedenen Verdünnungen.

---

### 2.2.12.3 Gramicidinextraktion für Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurde die Gramicidinextraktion wie bei EDWARDS [1993] beschrieben durchgeführt und diente als optischer Nachweis für Gramicidin S.

Es wurden 2 ml der Bakterienkultur in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei 8000 rpm für 10 min ab zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 200 µl Ethanol (98 %) (1/10 der Bakterienkultur) resuspendiert. Diese Suspension wurde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler eine Stunde leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 8000 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und konnte dann für die Dünnschichtchromatographie verwendet werden.

### 2.2.12.4 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf einer Celluloseplatte (Merck) durchgeführt. Dazu wurden 2 – 4 µl der Gramicidinlösung (siehe 2.2.12.3) auf die Platten in einem Abstand von 1 cm punktförmig aufgetragen und mit einem Laufmittel aufgetrennt. Als Gramicidin Standard diente eine 0,01 % ethanolische Gramicidin S-Lösung (Sigma).

Nach dem Lauf wurden die Platten trocknen gelassen und anschließend mit einer 0,5 %igen Ninhydrinlösung besprüht. Nach dem Abtrocknen der Ninhydrinlösung wurden die Platten entweder über einer Heizplatte oder bei 80 °C für 30 min in einem Ofen entwickelt.

Der Retentionsfaktor (Rf-Wert) gibt die relative Laufstrecke der einzelnen Banden an und errechnet sich aus dem Weg der Banden durch den Weg der Laufmittelfront.

#### Laufmittel

4 Teile	Butan-1-ol (Roth)
1 Teil	Eisessig (Roth)
1 Teil	VE-Wasser

#### Färbelösung

0,5 g	Ninhydrin (Merck)
100 ml	Butan-1-ol (Roth)

---

## 2.2.13 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.13.1 DNA Isolierung aus Blattmaterial von *Cucumis sativus*

Für die Isolierung der genomischen DNA wurden zwei ca. drei Wochen alte Gurkenpflanzen im Zweiblattstadium genutzt. Es wurde mit einem Korkbohrer je eine Blattscheibe ausgestanzt ( $\varnothing$  1,3 cm) und in je ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie wurden anschließend mit einem Micropistill (Eppendorf) im Mikrozentrifugenröhrchen zerkleinert. Noch im gefrorenen Zustand wurden je 400  $\mu$ l Lysepuffer (AP1) und 4  $\mu$ l RNase A stock solution (100 mg/ml) zugegeben. Nach Zugabe von 130  $\mu$ l Lysepuffer (AP2) wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen QIAshredder-Filter pipettiert und 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde unter Vermeidung des Pellets in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1,5 Volumen Bindepuffer (AP3) wurde der Ansatz durch Pieptieren gemischt. 650  $\mu$ l dieses Ansatzes wurde auf ein DNeasy Mini spin-Säule pipettiert und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem restlichem Ansatz wiederholt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l Waschpuffer (AW) wurde 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule nochmals 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um noch vorhandene Pufferreste zu entfernen. Die Säule wurde auf ein frisches 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Elutionspuffer (EB) auf die Säule pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Es wurde 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert, um die DNA zu eluieren. Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -28 °C gelagert.

### 2.2.13.2 DNA Isolierung aus *A. migulanus* mit Hilfe der Chelex-Methode

Von den aus der Kultivierung erhaltenen Stämmen von *Aneurinibacillus migulanus* wurden sechs molekularbiologisch bestimmt. Die Stämme waren *A. migulanus* Wildtyp, E1, Bioprotect, Typ weiß, Typ transluzent und Typ Nr. 10.

Dazu wurden in 60 ml TSB Kulturen angezogen (inkubiert ca. 24h bei 37 °C und 150 rpm). Davon wurden 2 ml abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die DNA mittels Chelex-Methode extrahiert [WALSH et al. 1991].

Dazu wurden je 100  $\mu$ l Chelex-Lösung (20 %) auf das Zellpellet gegeben und gründlich gevortext für mindestens 30 sec. Anschließend wurde die Suspension für etwa 20 sec bei 16000 xg und 4 °C abzentrifugiert. Dann erfolgte ein Inkubationsschritt für 30 min bei 56 °C, um die Zellen zu lysieren. Dann wurde die Suspension ein weiteres mal gevortext für etwa

---

30 sec und anschließend abzentrifugiert für 20 sec bei 16000 xg und 4 °C. Nach einer anschließenden Inkubation des Ansatzes für 10 min bei 100 °C wurden die festen Bestandteile 3 min bei 16000 xg und 4 °C abzentrifugiert. Im Überstand befand sich nun die DNA, die in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen überführt wurde.

#### 20 % Chelex

200 µg	Chelex Matrix 100 (Bio-Rad)
1 ml	HPLC-Wasser (ROTH)

Chelex Matrix wurde in sterilem HPLC-Wasser aufgenommen und nach mehreren Waschschritten in je 1 ml HPLC-Wasser resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

#### **2.2.13.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Die PCRs wurden mit einem Biometra T Gradient Cycler durchgeführt. Die Annealing-Temperatur, Elongations-Zeit und Anzahl der Zyklen waren abhängig vom jeweiligen PCR-Produkt und Primer. Die Reaktionen wurden in 0,2 ml PCR-Gefäßen mit einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt. Vor der Zugabe von je 0,3 µl Taq-Polymerase (Qiagen) wurde der Ansatz für 10 min bei 98 °C erhitzt und anschließend für mind. 5 min bei auf Eis abgekühlt. Die Qualität der PCR-Produkte wurde anschließend mittels eines Agarose-Gels (1 - 2 %ig) kontrolliert (siehe 2.2.13.4).

#### Ansatz

0,5 - 1 µl	Template
2,5 µl	Puffer (10x)
1 µl	dNTP (10 mM)
0,5 µl	primer Fw (100 pmol/µl)
0,5 µl	primer Rw
0,3 µl	Polymerase
ad 25µl	VE-Wasser (steril)

---

#### PCR Programm (generell)

- 1) 94 °C      1:00 min
- 2) 94 °C      0:30 min
- 3) x °C      0:30 min
- 4) 72 °C      x min

Wiederholung der Schritte 2 bis 4 in 29 bis 34 Zyklen

- 5) 72 °C      5:00 min
- 6) 4 °C      ∞

#### **2.2.13.4 Gelelektrophorese**

Je nach Versuch wurden 3 - 5 µl PCR-Produkt auf ein 1 % oder 2 % Agarose-Gel in 1x TAE-Puffer aufgetragen. Als molekularer Größenstandard wurde eine 100 bp oder 1 kb DNA ladder von NEB verwendet. Anschließend wurde das Gel für etwa 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,001 %) gefärbt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einer Geldokumentationsanlage von Syngene.

#### 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)

- 242 g      Tris Base
- 57,1 ml      Eisessig
- 100 ml      0,5 M EDTA (pH 8,0)
- ad 1000 ml      VE-Wasser

#### Ethidiumbromid

- 1 ml      Ethidiumbromidlösung (1 %ig, Roth)
- 1 L      1x TAE-Puffer

#### **2.2.13.5 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Dazu wurden 5 Volumen Bindepuffer auf 1 Volumen PCR-Reaktion gegeben und gemischt. Diese Lösung wurde dann auf ein QIAquick Säule pipettiert und bei 6000 rpm 60 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nochmals auf die Säule gegeben und die Zentrifugation wurde noch einmal wiederholt, um eine bessere Absorption zu erreichen. Um

---

die auf der Säule befindliche DNA zu waschen, wurden 750 µl Puffer Waschpuffer pipettiert und 60 sec bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Pufferreste zu entfernen. Die Säule wurde in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die DNA durch Zugabe von 30 µl Elutionspuffer von der Säule desorbiert. Nach Einwirkzeit von 1 min wurde 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die PCR-Produkte wurden bei -28 °C gelagert.

#### **2.2.13.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

Die Konzentrationsbestimmung der RNA- und DNA-Proben wurde mit einem Spektrophotometer der Firma Eppendorf durchgeführt. Dazu wurde die Optische Dichte von 1: 100 verdünnten Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

#### **2.2.13.7 Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Seqlab in Göttingen [[www.seqlab.de](http://www.seqlab.de)] durchgeführt. Hierfür wurde 25 ng/100 bp aufgereinigtes PCR-Produkt enthalten in einem Volumen von insgesamt 6,7 µl mit 0,3 µl Sequenzierprimer (=30 pmol) gemischt.

#### **2.2.13.8 Vorbereitung quantitative Real-Time PCR**

Mit Hilfe einer quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) lassen sich Unterschiede in der Menge der mRNA quantifizieren. In dieser Arbeit sollten Unterschiede in der Expression von mRNAs, welche für Proteine der Pflanzenabwehr kodieren, untersucht werden.

Hierfür wurden die Pflanzen mit den zu testenden Extrakten und Bakterienkulturen auf beiden Blattseiten eingesprüht und so aufgestellt, dass sie abtrocknen konnten. Nach 24 und 48 h wurde mit einem Korkbohrer (Ø 1,3 cm) eine Blattscheibe ausgestanzt und in einem Mikrozentrifugenröhrchen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zur Bearbeitung bei -80 °C gelagert. Pro Variante wurden 6 Proben von 3 verschiedenen Pflanzen genommen.

---

#### 2.2.13.9 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt.

Zuerst wurden die Proben in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Micropistill (Eppendorf) zerkleinert und nach Zugabe von 350 µl Lysepuffer (+β-Mercapthoethanol) noch einmal gemörsert. Um die groben Bestandteile zu entfernen, wurde das Lysat auf einen NucleoSpin Filter gegeben und 1 min bei 11000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend mit 350 µl 70 % Ethanol gemischt und auf eine NucleoSpinRNA Säule pipettiert und für 30 s bei 11000 xg zentrifugiert. Danach wurden 350 µl Membranentsalzungspuffer auf die Säule gegeben und für 1 min bei 11000 xg zentrifugiert. Um DNA zu entfernen, wurden 95 µl rDNase Mix auf die Säule pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Waschpuffer (RA2) wurde 30 sec bei 11000 xg zentrifugiert. Danach wurden 600 µl Waschpuffer (RA3) auf die Säule pipettiert und wiederum 30 sec bei 11000 xg zentrifugiert. Es wurden noch einmal 250 µl RA3 auf die Säule pipettiert und 2 min sec bei 11000xg zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend auf ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß überführt. Dann wurden 60 µl RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert und 1 min bei 11000 xg zentrifugiert, um die RNA zu eluieren.

Die gewonnene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.13.10 Denaturierende RNA Gelelektrophorese

Um die Qualität der RNA-Isolierung zu überprüfen, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden je 8 µl isolierte RNA mit 2 µl Ladepuffer gemischt, für 5 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Proben auf ein 1,2 % formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetragen. Die RNA-Gele wurden mit Geldokumentationsanlage von Syngene dokumentiert.

##### RNase-freies Wasser

1 ml Diethyldicarbonat (DEPC) in 1000 ml destilliertem Wasser lösen und ca. 24 h stehen lassen. Die Flasche wurde mehrfach geschüttelt, so dass alle Wände und auch der Deckelbereich benetzt wurden. Anschließend wurde 20 min bei 121 °C autoklaviert.

##### 10 x MOPS-EDTA-SODIUM-ACETAT Puffer (MESA-Puffer)

von Sigma Aldrich in 1L DEPC-Wasser gelöst

---

#### Formaldehydhaltiges Agarosegel (FA)

1,2 g	Neo-Agarose (Roth)
10 ml	10 x MESA-Puffer (Sigma)
ad 100 ml	DEPC-Wasser

Die Agarose wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle im Puffer gelöst und anschließend auf etwa 65 °C abgekühlt. Es wurden dann 1,8 ml Formaldehyd (37 %) und 1 µl Ethidiumbromid (1 %, Roth) dazugegeben.

#### 1x FA Gel Laufpuffer

100 ml	10 x MESA Puffer
20 ml	Formaldehyd (37 %, Roth)
880 ml	DEPC-Wasser

#### 5x RNA Ladepuffer

16 µl	gesättigte, wässrige Bromphenolblau-Lösung
80 µl	500 mM EDTA (pH 8,0)
720 µl	Formaldehyd (37 %, Roth)
2 ml	Glycerol (100%, Roth)
3,084 ml	Formamid (Roth)
4 ml	10x MESA Puffer
ad 10 ml	DEPC-Wasser

#### **2.2.13.11 DNase Verdau**

Um zu gewährleisten, dass keine Rest-DNA die qRT-PCR stört, wurde ein zusätzlicher DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Menge der gewonnenen RNA über eine OD<sub>260</sub>-Messung bestimmt (siehe 2.2.15.6). Der DNase-Verdau wurde mit Hilfe der DNase I von Fermentas durchgeführt. Die Proben wurden gemischt und für 30 min bei 37 °C im Cyclex (BiometraT-Gradient) inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde 1 µl EDTA (50 mM) dazu gegeben und der Ansatz bei 65 °C für 10 min inkubiert.



---

### Ansatz

x µl	RNA (1 µg)
1µl	10x Puffer
1 µl	DNase I
ad 10 µl	DEPC-Wasser

### 2.2.13.12 Reverse Transkription (RT-PCR)

Mit Hilfe der reversen Transkription wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für diese Arbeiten wurde das iScript cDNA Synthese Kit von Bio-Rad benutzt. Die reverse Transkription wurde in 0,2 ml PCR-Gefäßen in einem Biorad T-Gradient Cyclyer bei 42 °C durchgeführt.

### Ansatz

4 µl	5x iScript reaction mix
1 µl	iScript reverse transcriptase
5 µl	RNA template aus DNase Verdau
10 µl	Nuclease free water

### Cycler-Program

1) 25 °C	5:00 min
2) 42 °C	30:00 min
3) 85 °C	5:00 min
4) 4 °C	∞

### 2.2.13.13 Quantitative Real-TimePCR (qRT-PCR)

Um eine Veränderung in der Menge der jeweiligen mRNAs für festzustellen, wurde eine quantitative Real time-PCR (qRT-PCR) genutzt. Als Template diente cDNA, welche aus isolierter RNA gewonnen wurde. Die qRT-PCR wurde in einer DNA Engine Opticon (Biometra) durchgeführt. Es wurden vier verschiedene Primerpaare benutzt (Tab. 2-1), welche auf die Sequenzinformationen von XIA et al. [2009] zurückgeführt und zum Teil modifiziert wurden. Die PCR Produkte wurden mittels Fluoreszenz detektiert und nach jedem Cycler-Schritt gemessen. Als Polymerase wurde SYBR Green von Fermentas benutzt. SYBR

---

Green bindet dabei an die doppelsträngige DNA. Es wird durch Licht der Wellenlänge von ~497 nm angeregt und emittiert Wellenlängen von ~520 nm. Ein Anstieg in der SYBR Green Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg an PCR-Produkt. Die Kontrolle der Qualität des Produktes wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse geprüft. Als Referenz mit bekannter DNA Konzentration wurde genomische DNA aus *Cucumis sativus* in verschiedenen Verdünnungen (20 – 0,02 ng) eingesetzt.

#### Ansatz

2 µl	Template (cDNA)
12,5 µl	SYBRGreen (Fermentas)
1 µl	Primer Fw (10 pM)
1 µl	Primer Rw (10 pM)
8,5 µl	Wasser (mitgeliefert)

#### PCR-Bedingungen

- 1) 95 °C      3:00 min
- 2) 95 °C      0:30 min
- 3) 57 °C      0:30 min
- 4) 72 °C      0:30 min

Wiederholung der Schritte 2 bis 4 in 40 Zyklen

- 5) 72 °C      7:00 min
- 6) 10 °C      ∞

## **2.2.14 Statistische und bioinformatische Datenanalyse**

### **2.2.14.1 Befallsauswertung**

Die Wirkungsgrade der Biotests wurden aus den Mittelwerten des Befalls mit der nachfolgenden Formel ermittelt.

$$\text{Wirkungsgrad [\%]} = \frac{\text{Befall der Kontrolle [\%]} - \text{Befall der Variante [\%]}}{\text{Befall der Kontrolle [\%]} * 100}$$

---

#### 2.2.14.2 Berechnung EC<sub>50</sub>

Zur Berechnung der mittleren effektiven Konzentration (EC<sub>50</sub>) der Präparate wurde eine Probit-Analyse mittels der MLP Software (Version 3.08) durchgeführt. Die Wirkungsgrade der Versuche wurden aus den Mittelwerten des Befalls berechnet (siehe 2.2.14.1) und mit nachfolgender Formel in „response data“ umgerechnet. Mit diesen Daten wurde dann die Probit-Analyse ausgeführt.

response data = n \* Wirkungsgrad [%]/ 100

n = Anzahl der Versuchsglieder

#### 2.2.14.3 Signifikanztests

Die ermittelten Daten wurden mit der Software SAS (Version 11.3) statistisch ausgewertet. Signifikante Unterschiede wurden mit einer ANOVA mit Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ) ermittelt. Die Daten aus den Biotests, bei denen der Befall abgeschätzt wurde, wurden zuvor Arcus-Sinus transformiert.

#### 2.2.14.4 Phylogenetische Rekonstruktion und p-Abstandsmatrix

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mittels der CLUSTAL W Funktion [THOMPSON et al. 1994] des MEGA 5 Programmes [TAMURA et al. 2011] unter Verwendung der IUB DNA weight Matrix mit publizierten Sequenzdaten [GOTO et al. 2004] verglichen. Datensatz-spezifische Parameter wie Nukleotid-Häufigkeiten und der alpha-Parameter wurden mit der TREE PUZZLE 5.2 Software [SCHMIDT et al. 2002] ermittelt. Die Phylogenie-Rekonstruktion nach der Maximum-Likelihood (ML) Methode erfolgte unter Verwendung der PhyML Software [GUINDON & GASCUEL 2003] unter der Annahme des Hasegawa-Kishino-Yano-Modells (HKY) für Nukleotidsubstitution [HASEGAWA et al. 1985]. Die Vertrauenswürdigkeit von Stammbaumtopologien wurde durch eine nicht-parametrische Bootstrapping-Analyse über 1.000 Pseudoreplikationen abgeschätzt.

Für die Stämme der Art *A. migulanus* wurde in MEGA 5 unter paarweiser Berücksichtigung lückenhafter Alignment-Positionen eine paarweise p-Abstandsmatrix berechnet.

---

### 2.2.15 Fotobearbeitung

Mit Hilfe des Programmes Adobe Photoshop 7.0 wurden die Bilder in dieser Arbeit bearbeitet. Sie wurden mit diesem Programm in der Größe verändert, zum Teil in Helligkeit und Kontrast verbessert und zusammengefasst

---

### 3 Ergebnisse

---

#### 3.1 Wirkung und Wirkweise des Extraktes aus *Macleaya cordata* und der Bakterienkultur aus *Aneurinibacillus migulanus*

##### 3.1.1 Bestimmung der effektiven Konzentration (EC<sub>50</sub>)

Zu Beginn der Versuchsreihen wurden die EC<sub>50</sub>-Werte des Extraktes aus *M. cordata* und der Bakterienkultur von *A. migulanus* in Biotests im System Gurke – Falscher Mehltau (*Pseudoperonospora cubensis*) evaluiert. Die generelle Wirkung des Extraktes sowie des Bakterienpräparates gegen den Falschen Mehltau war schon aus Vorversuchen bekannt. Hier wurden aus der Konzentration der Präparate und dem jeweiligen Wirkungsgrad die EC<sub>50</sub> Werte ermittelt, d.h. die Konzentration, bei der im Biotest ein Wirkungsgrad von 50 % erreicht wird. Für die Versuche wurden jeweils zwei Pflanzen mit zwei Blättern pro Behandlung in vier Wiederholungen eingesetzt.

Der Extrakt aus *M. cordata* war schon in sehr geringen Konzentrationen hoch wirksam. Bis zu einer Konzentration von 40 µg/ml konnten immer noch Wirkungsgrade von über 90 % erreicht werden. So ließen sich bei den Konzentrationen 10 µg/ml und 5 µg/ml Wirkungsgrade von 78,57 %, bzw. 66,43 % ermitteln (Abb. 3-2). Daraus wurde eine EC<sub>50</sub> von 2,9 µg/ml errechnet (Tab. 3-1). In den Versuchen zeigte sich, dass der Extrakt in höheren Konzentrationen (über 100 µg/ml, Abb. 3-1) zu einer Gelbfärbung der Gurkenblätter führt, was auf eine phytotoxische Reaktion hindeutet.

In einem Biotest in der Klimakammer mit der Kulturbrühe von *A. migulanus* weiß zeigte sich ebenfalls eine Dosis-Wirkung-Abhängigkeit (Abb. 3-3). Mit der unverdünnten Kulturbrühe ließ sich ein Wirkungsgrad von 94,28 % erzielen. Je höher die Kulturbrühe verdünnt wurde, desto höher war der Befall mit *P. cubensis* und desto geringer war der Wirkungsgrad. So betrug der Befall nach Applikation der 1:20 verdünnten Kulturbrühe 53,75 %, woraus ein Wirkungsgrad von 43,42 % resultierte. Ein Wirkungsgrad von etwa 50 % (EC<sub>50</sub>) ließ sich mit ca. 6 % der Flüssigkultur erzielen, was einem errechneten Gramicidingehalt von etwa 76,5 µg/ml entsprach (Tab. 3-1). Die Bestimmung des Gramicidingehaltes in der *A. migulanus* Kulturbrühe ist in Kapitel 3.1.8.1 dargestellt.

In einem weiteren Biotest wurde auch die Wirkung von reinem Gramicidin S (Sigma) auf den Falschen Mehltau untersucht (Abb. 3-4). Mit einer Konzentration von 500 µg/ml wurde bei einem Mehltau-Befall von 11,25 % ein Wirkungsgrad von 88,07 % erzielt. Mit zunehmender Verdünnung der Gramicidinkonzentration stieg der Befall an und bei einer Konzentration von

25 µg/ml betrug der Wirkungsgrad nur noch 9,34 %. Es wurde eine EC<sub>50</sub> von 106,1 µg/ml errechnet (Tab. 3-1).

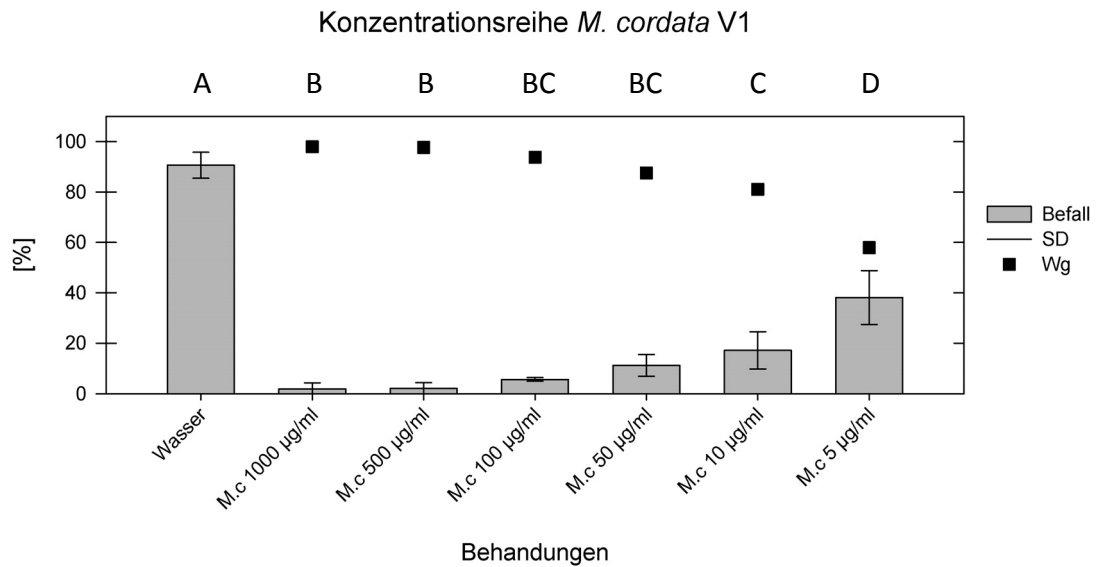


Abb. 3-1: Wirkung eines Extraktes aus *M. cordata* (M.c) in den Konzentration 1000 – 5 µg/ml gegen *P. cubensis* an Gurke; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ), SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

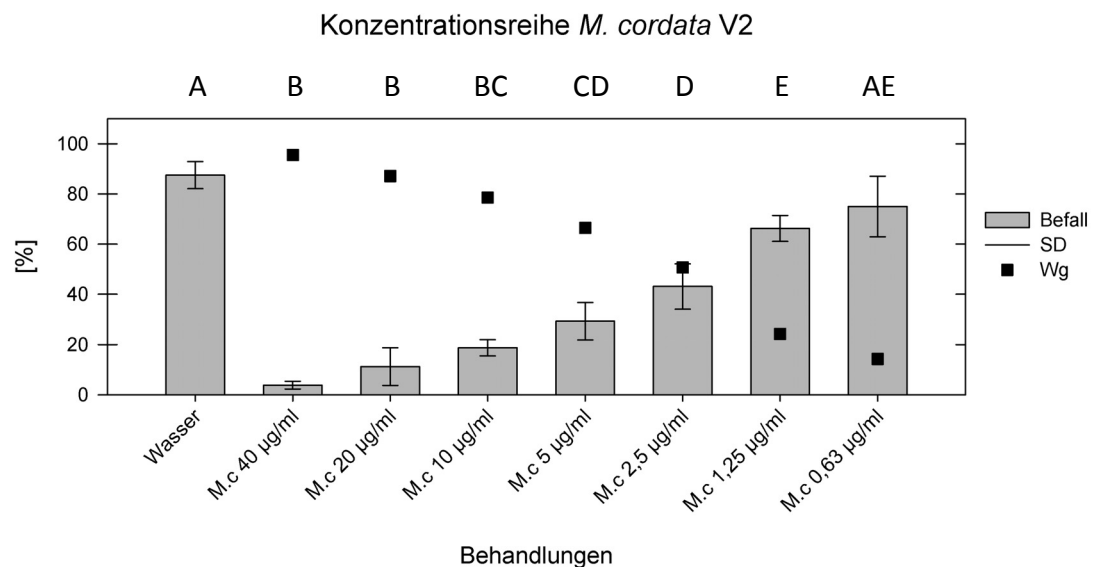


Abb. 3-2: Wirkung eines Extraktes aus *M. cordata* (M.c) in den Konzentrationen von 40 - 0,63 µg/ml gegen *P. cubensis* an Gurke; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ), SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

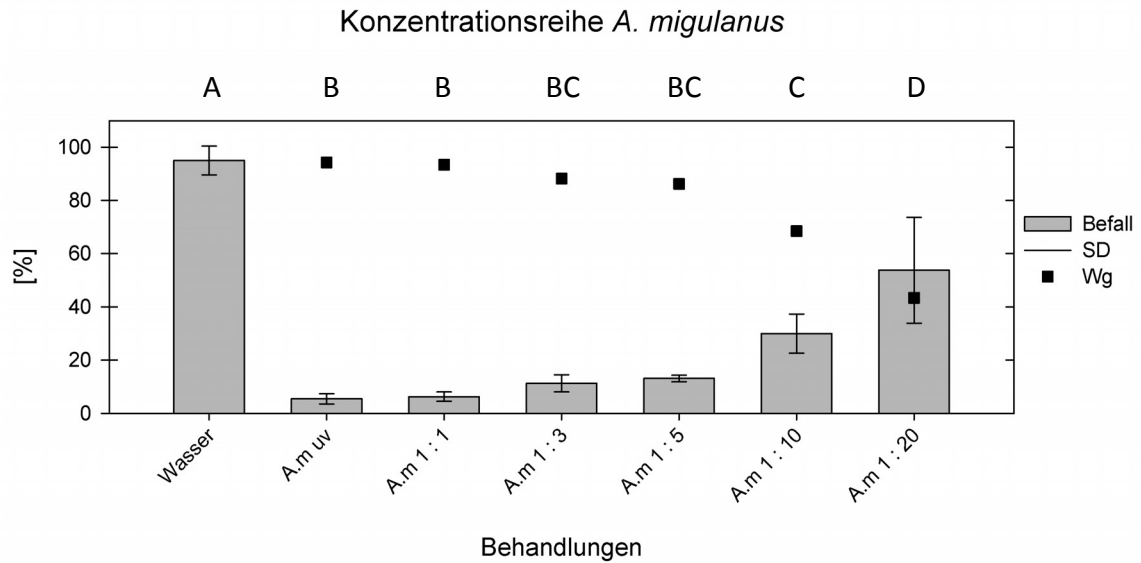


Abb. 3-3: Wirkung einer fünf Tage alten *A. migulanus* weiß Kulturbrühe (A.m) in steigender Verdünnung (unverdünnt – 20fach) gegen *P. cubensis* an Gurke; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ), SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

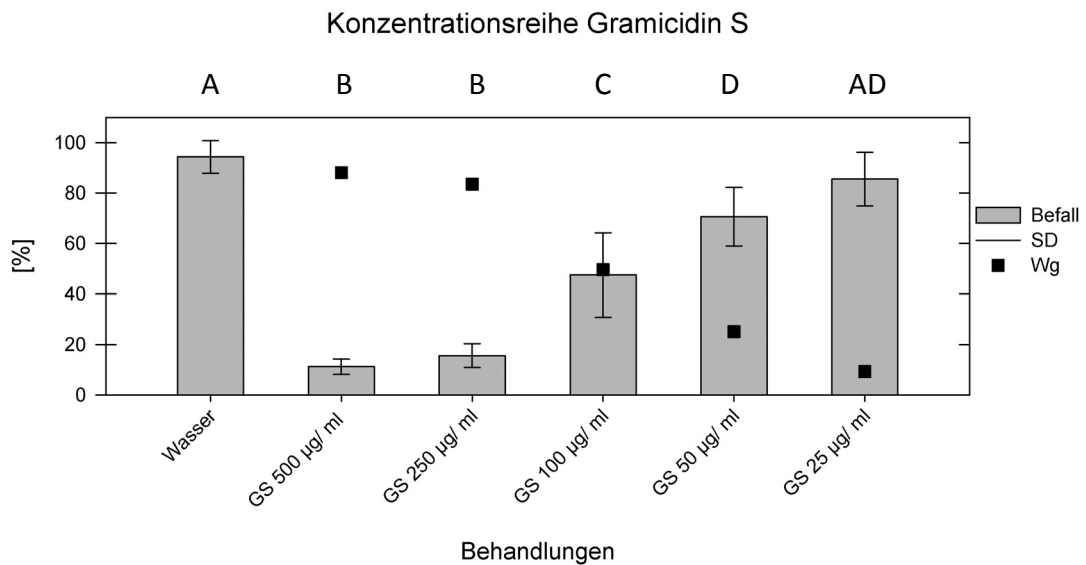


Abb. 3-4: Wirkung von synthetischem Gramicidin S (GS) in Konzentrationen von 500 – 25 µg/ml gegen *P. cubensis* an Gurke; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ), SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

Tab. 3-1: Auf einer Probit-Analyse basierende EC<sub>50</sub>-Werte und Konfidenzintervalle errechnet aus den Daten von Konzentrationsreihen mit den Präparaten *M. cordata*-Extrakt, *A. migulanus* und Gramicidin S (Abb. 3-4 bis 3-7).

Name	EC <sub>50</sub>	Konfidenzintervall
<i>Macleaya cordata</i>	2,9 µg/ml	0,18 – 0,44
<i>Aneurinibacillus migulanus</i> weiß	6 % der Kulturbrühe entspricht ca. 76,5 µg/ml Gramicidin S	24,5 – 127,5
Gramicidin S	106,1 µg/ml	65,1 – 167,7

### 3.1.2 Protektive und kurative Wirkung

Untersuchungen zur protektiven oder kurativen Wirkung können einen ersten Hinweis auf die Wirkweise und Einsatzmöglichkeiten eines biologischen Agens geben.

Für die Abschätzung einer protektiven bzw. kurativen Wirkung wurden die Pflanzen einen Tag vor oder einen, drei oder fünf Tage nach Inokulation mit *P. cubensis* mit dem Extrakt aus *M. cordata* (50 µg/ml) oder einer 1:1 Verdünnung der Kulturbrühe von *A. migulanus* weiß behandelt. Zehn Tage nach der Inokulation wurde ausgewertet (Abb. 3-5). Es wurden je acht Pflanzen im Zweiblattstadium genutzt.

Die Behandlung der Gurkenpflanzen mit der Kulturbrühe von *A. migulanus* einen Tag vor der Inokulation führte wie erwartet zu einem Wirkungsgrad von über 90 %. Bei einer Behandlung einen Tag nach der Inokulation mit *P. cubensis* nahm die Wirkung stark ab und der Befall stieg etwa auf 78,44 % an. Wurden die Pflanzen fünf Tage nach der Inokulation mit *A. migulanus* behandelt, wurde ein Befall von 86,44 % abgeschätzt, welcher auf dem Niveau der Wasserkontrolle (88,0 %) lag. Es ließ sich kein Wirkungsgrad feststellen.

Die Behandlung der Gurkenpflanzen mit dem *M. cordata* Extrakt einen Tag vor der Inokulation führte zu einem Wirkungsgrad von 82,01 % bei einem Befall von 15,83 %. Die Applikation des Extraktes zeigte bereits einen Tag nach der Inokulation mit *P. cubensis* keine Wirkung mehr, so dass der Befall auf 86,81 % anstieg. Nach der Behandlung fünf Tage nach Inokulation nahm der Befall etwas ab und es wurde ein Wirkungsgrad von 10,94 % errechnet. Die leichten Veränderungen der Wirkungsgrade bei kurativer Anwendung lagen jedoch im Bereich natürlicher Schwankungen.

Bei beiden angewendeten Präparaten führten nur die Behandlungen vor der Inokulation zu einem signifikanten Unterschied des Befalls im Vergleich zur Wasserkontrolle.



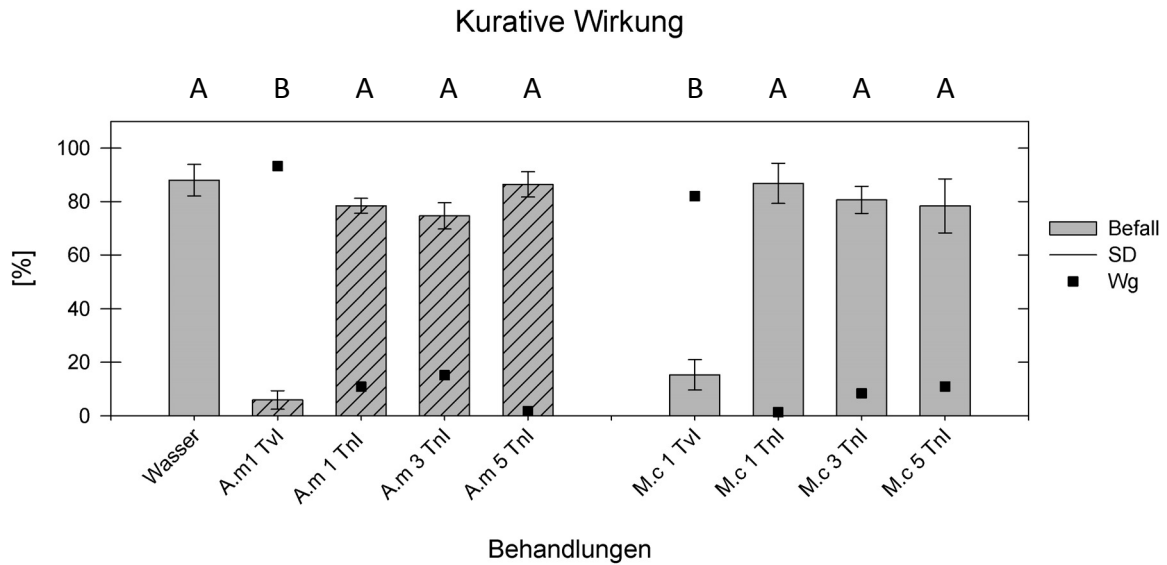


Abb. 3-5: Kurative Wirkung einer fünf Tage alten Flüssigkultur von *A. migulanus* (A.m; 1:1 verdünnt) und eines Extraktes aus *M. cordata* (M.c; 50 µg/ml) gegen *P. cubensis* an der Gurke. Die Behandlung der Pflanzen fand einen Tag vor (TvI) oder einen, drei oder fünf Tage nach der Inokulation (TnI) mit dem Pathogen statt; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ), SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

### 3.1.3 Translaminare Wirkung

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob es eine Verlagerung der Wirkung im Blatt gibt. Dazu wurden die Pflanzen entweder nur auf der einen Blatthälfte (getrennt durch die Mittelrippe) auf der Blattunterseite oder vollständig auf der Blattober- oder -unterseite mit einer 1:1 Verdünnung der Kulturbrühe von *A. migulanus* oder dem Extrakt aus *M. cordata* (0,50 µg/ml) behandelt. Am darauffolgenden Tag wurde die gesamte Blattunterseite mit *P. cubensis* inokuliert. Es wurden acht Pflanzen pro Variante benutzt und die Abschätzung des Befalls fand zehn Tage nach der Inokulation statt (Abb. 3-6).

Im allgemeinen waren Blätter, die einseitig mit einem der Präparate behandelt worden waren, nur auf der behandelten Blattseite geringer befallen. Die unbehandelten Seiten wiesen Befallswerte von 82,19 - 92,50 % auf, was dem Befall in der Wasserkontrolle (93,44 %) entsprach. Diese Werte waren nicht signifikant verschieden zur Kontrolle.

Die auf der gesamten Blattunterseite behandelten Pflanzen zeigten Befallswerte von 10,13 - 10,84 %, was einem Wirkungsgrad zwischen 89,16, und 88,39 % entsprach. Wurden die Pflanzen auf der Blattunterseite einseitig, getrennt durch die Mittelrippe auf nur einer Blatthälfte (rechts) behandelt, so ließen sich dort Wirkungsgrade von 78,60 - 85,22 %

ermitteln. Die Behandlungen auf der Blattunterseite führten zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Wasserkontrolle.

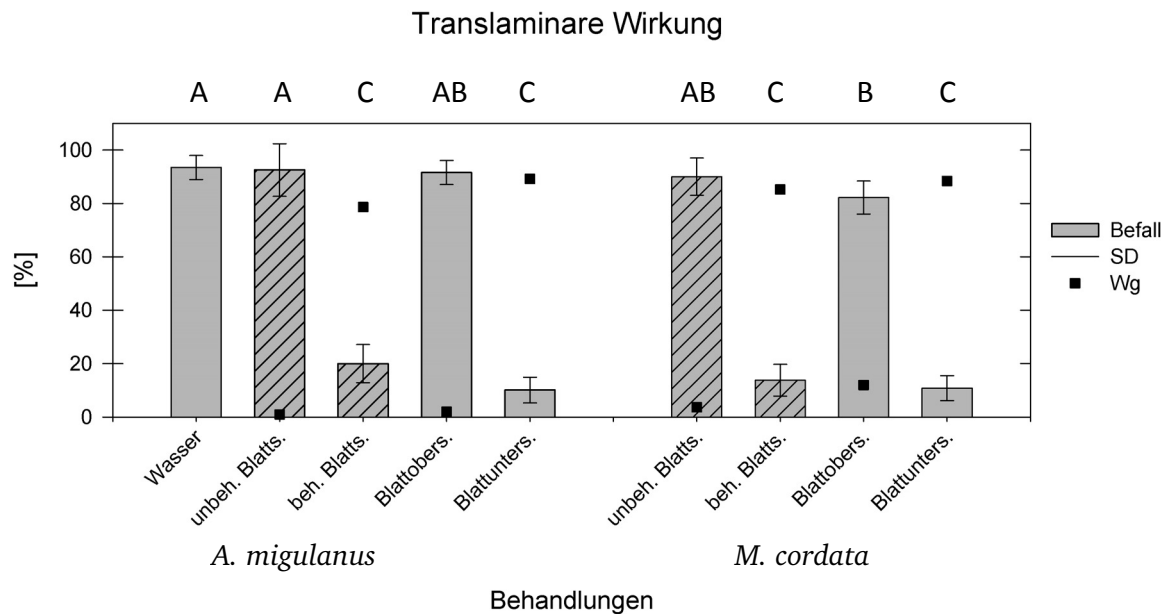


Abb. 3-6: Untersuchung der translaminaren Wirkung einer fünf Tage alten Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß (1:1 verdünnt) und eines Extraktes aus *M. cordata* (50 µg/ml) gegen *P. cubensis* an der Gurke durch Applikation der Präparate auf verschiedene Blattseiten. Die Pflanzen wurden auf der gesamten Blattunterseite mit *P. cubensis* inokuliert; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ). SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad, unbeh. Blattseite = unbehandelte Seite auf Blattunterseite getrennt durch die Mittelrippe, beh. Blattseite = behandelte Seite auf Blattunterseite getrennt durch die Mittelrippe, Blattoberseite = Blattoberseite behandelt, Blattunters. = Blattunterseite behandelt.

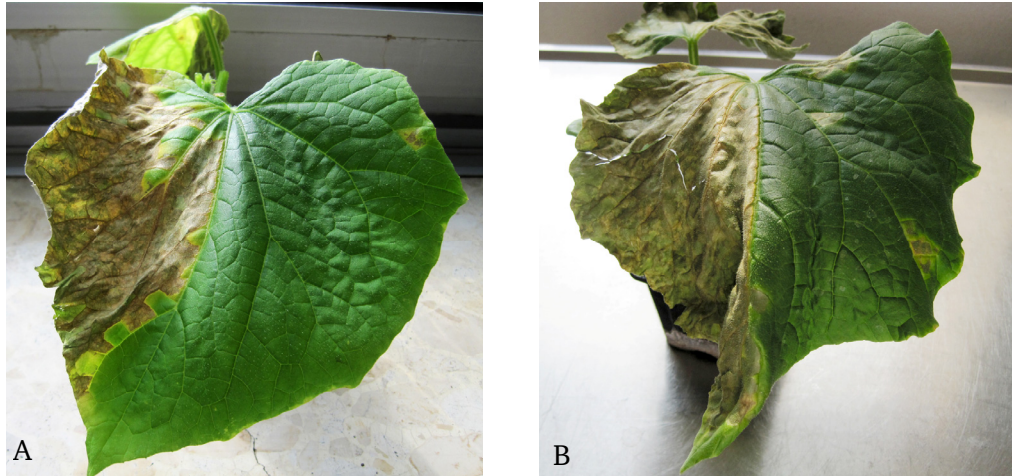


Abb. 3-7: Pflanzen von *C. sativus* mit halbseitigem Befall von *P. cubensis*. Die Pflanzen waren auf der rechten Blattunterseite mit A) *M. cordata* Extrakt (50 µg/ml) oder B) *A. migulanus* Flüssigkultur (1:1) behandelt worden. Nach einem Tag wurden sie auf der gesamten Blattunterseite mit *P. cubensis* inokuliert; der Befall mit *P. cubensis* zeigte sich durch Nekrosen nur auf der linken, unbehandelten Blathälfte.

#### 3.1.4 Wirkung der einzelnen Bestandteile einer *A. migulanus*-Flüssigkultur

Es ist bekannt, dass eine Flüssigkultur von *A. migulanus* zwei wirksame Substanzen enthält, die sich einfach trennen lassen. Nach Zentrifugation der Flüssigkultur befinden sich im Pellet die vegetativen Zellen und Sporen, an denen Gramacidin S haftet, im Überstand ist ein „Biosurfactant“ enthalten [LAZARDIS 1981, EDWARDS 1993, SEDDON et al. 1997].

Es wurden je sechs Pflanzen pro Variante mit dem Überstand, den gewaschenen Zellen oder der Gesamtkultur einer fünf Tage alten Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß behandelt. Nach der Auftrennung der Bestandteile wurden sie 1:1 mit VE-Wasser verdünnt und protektiv auf die Blattunter- oder Blattoberseite der Pflanzen aufgebracht. Die Auswertung fand zehn Tage nach der Inokulation statt. Es wurde die Wirkung der einzelnen Bestandteile sowie eine evtl. translaminare Verlagerung in der Pflanze untersucht (Abb. 3-8).

Alle Behandlungen, die auf der Blattunterseite durchgeführt wurden, bewirkten eine Verringerung des Befalls. Die Anwendung des Überstandes der Bakterienkultur führte zu einem Wirkungsgrad von 46,06 % und die Behandlung mit den gewaschenen Zellen zu einem Wirkungsgrad von 76,36 %. Mit der Gesamtkultur steigerte sich die Wirkung gegen *P. cubensis* auf 83,39 % und war additiv. Es zeigte sich, dass die Wirkung der Gesamtkultur nicht signifikant verschieden zur Wirkung der gewaschenen Zellen, jedoch zur Wirkung des Überstandes war.

Wurden die Blattoberseiten der Pflanzen mit den Bestandteilen der Bakterienkultur behandelt, so wurde, wie auch in Versuch 3.1.3, ein Anstieg des Befalls auf das Niveau der Wasserkontrolle (59,17 bzw. 68,75 %) beobachtet.

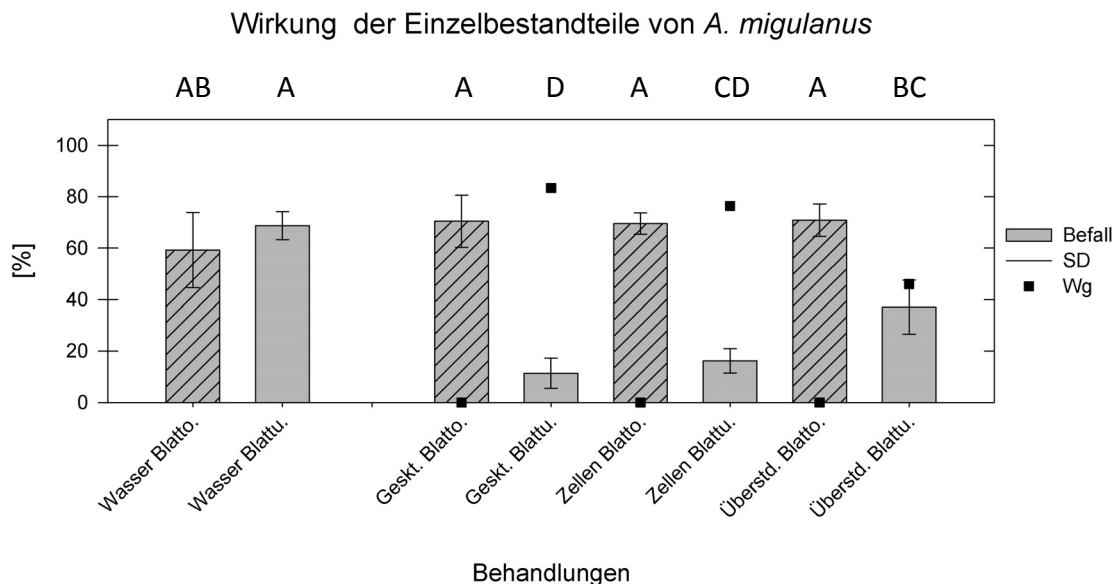


Abb. 3-8: Wirkung der einzelnen Bestandteile einer fünf Tage alten Flüssigkultur von *A. migulanus* (1:1 verdünnt) gegen *P. cubensis* an der Gurke. Die Pflanzen wurden mit der Gesamtkultur (Geskt.), den Zellen und dem Überstand (Überstd.) der *A. migulanus* Kultur auf der gesamten Blattoberseite (Blatto.) oder der Blattunterseite (Blattu.) behandelt; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ), SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

### 3.1.5 Einfluss des Abtrocknungseffektes auf den Befall mit *P. cubensis*

In den durchgeführten Biotests mit einzelnen Bestandteilen der Kultur von *A. migulanus* weiß fiel immer wieder auf, dass es in den Versuchen mit dem Überstand der Kulturbrühe zu einer Verringerung des Befalls von 10 bis 40 % im Vergleich zur Wasserkontrolle kam (s. z.B. Abb. 3-8). Aus der Literatur ist bekannt, dass *A. migulanus* einen Metaboliten in das Medium abgibt, der „Biosurfactant-Wirkung“ hat, d.h. zur schnelleren Abtrocknung der Blätter führt [EDWARDS 1993, SEDDON et al. 1997]. Um den Effekt dieser Abtrocknung erfassen zu können, wurden die Pflanzen einen Tag vor Inokulation mit einer 1:1 Verdünnung der Kulturbrühe von *A. migulanus* WT besprüht. Ein Teil der Pflanzen wurde sofort nach der Inokulation mit *P. cubensis* unter einer Plastikhaube feucht gestellt. Weitere Varianten wurden erst nach Ablauf einer Wartezeit feucht und abschließend dunkel gestellt. Die in Abb. 3-9 bis 3-11 dargestellten Wirkungsgrade wurden mit der jeweiligen Wasserkontrolle derselben

Abtrocknungsdauer errechnet. Die Abbildungen 3-9 und 3-10 zeigen Versuche mit 2 bzw. 3 Pflanzen pro Variante. In Abb. 3-11 ist ein Biotest mit acht Pflanzen pro Variante dargestellt. Der Testorganismus ist hier *A. migulanus* E1, welcher nur das Bionetzmittel produziert. Der Befall wurde zehn Tage nach Behandlung abgeschätzt.

Das Abtrocknen der Pflanzen führte schon in den Wasserkontrollen zu einer Verringerung des Befalls (Abb. 3-9 und 3-10). Die *A. migulanus* WT Gesamtkultur sowie die Zellen bewirkten auch ohne Abtrocknungsdauer eine starke Befallsverminderung. Wurde nur der Überstand appliziert, so war in diesem Versuch eine Dauer von 30 min notwendig, um einen Wirkungsgrad von über 60 % zu erzielen (Abb. 3-9).

Der Versuch mit *A. migulanus* WT Überstand, einer Gesamtkultur von E1 und E1 Überstand zeigte (Abb. 3-10), dass der *A. migulanus* WT Überstand hier ohne Abtrocknungszeit einen Wirkungsgrad von 46,46 % bewirkte, welcher sich nach längere Abtrocknungszeit auf 77,70 % steigerte. Die beiden Behandlungen mit E1 Gesamtkultur und E1 Überstand führten ohne Abtrocknungszeit zu einem Wirkungsgrad von 10,10 bzw. 20,20 %. Nach 30 min Abtrocknung betrugen die Wirkungsgrade 60,82 bzw. 73,71 %.

Abtrocknungsversuch *A. migulanus* WT

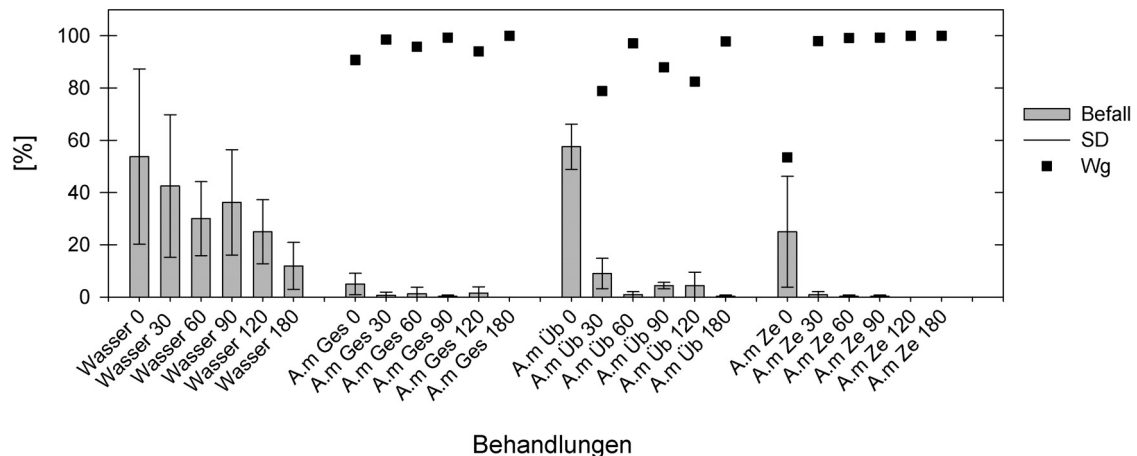


Abb. 3-9: Wirksamkeit einer fünf Tage alten Kulturbrühe von *A. migulanus* und ihrer Bestandteile, wenn die Pflanzen nach der feuchten Inokulation mit *P. cubensis* verschieden lange abtrocknen konnten (0 – 180 min). Am = *A. migulanus*, Ges = Gesamtkultur, Üb = Überstand, Ze = Zellen; die Zahlen geben die Abtrocknungsdauer in min nach der Inokulation an. SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

### Abtrocknungsversuch *A. migulanus* WT und E1

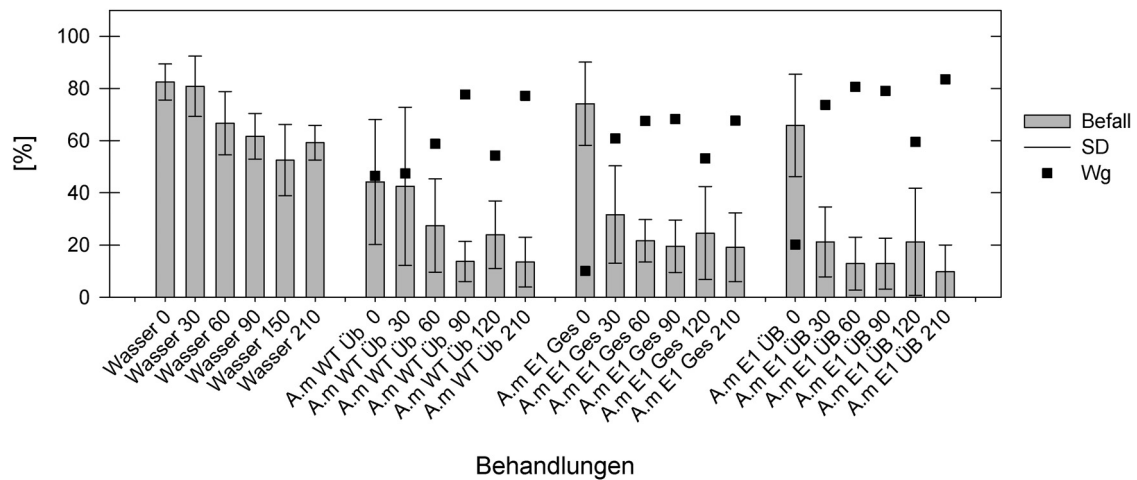


Abb. 3-10: Wirksamkeit einer fünf Tage alten Kulturbrühe von *A. migulanus* Wildtyp (WT) im Vergleich zu einer *A. migulanus* Typ E1 Kultur (E1), wenn die Pflanzen nach der feuchten Inokulation mit *P. cubensis* verschieden lange abtrocknen konnten. Am = *A. migulanus*, Ges = Gesamtkultur, ÜB = Überstand; die Zahlen geben die Abtrocknungsdauer in min nach der Inokulation an. SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

Der Versuch mit *A. migulanus* E1 Gesamtkultur (Abb. 3-11) bestätigte noch einmal die beiden vorangegangenen Versuche. Es zeigte sich, dass das Abtrocknen des Spritzbelages in der Wasserkontrolle generell zu einer Verringerung des Befalls führte. Die Befallsverminderung wurde stärker, je länger die Pflanzen abtrocknen konnten. Ohne Abtrocknung betrug der Befall in der Wasserkontrolle 75,63 % und nach 120 min nur noch 13,13 %. Die Variante mit der Gesamtkultur von E1 zeigte ohne Abtrocknungszeit in diesem Versuch einen Wirkungsgrad von 43,8 % gegenüber der Wasserkontrolle (0 min). Betrachtete man sich die weiteren Varianten von E1, so war schon nach 30 min Abtrocknung ein Wirkungsgrad von 70,51 % zu sehen verglichen mit der Wasserkontrolle derselben Abtrocknungsdauer. In allen Varianten von E1 war der Befall signifikant verschieden zur Wasserkontrolle ohne Abtrocknung. Der Befall von E1 0 min war jedoch nicht signifikant verschieden von der Wasserbehandlungen mit 30 und 60 min Abtrocknungszeit.

In Tab. 3-2 wurden noch einmal die Wirkungsgrade A) relativ gegen die Wasserkontrolle der gleichen Abtrocknungsdauer und B) gegen die Wasserkontrolle t = 0 min dargestellt. Es ist auffällig, dass die Gesamtkultur von E1 0 min in etwa den gleichen Wirkungsgrad wie Wasser mit 30 min Abtrocknungszeit hatte (42,98 %, bzw. 43,8 %). In der Wasserkontrolle ließ sich

nach 120 min Abtrocknungsdauer ein Anstieg des Wirkungsgrades auf 82,64 % verzeichnen. Die gleiche Abtrocknungszeit führte bei E1 zu einem Wirkungsgrad von 95,21 %.

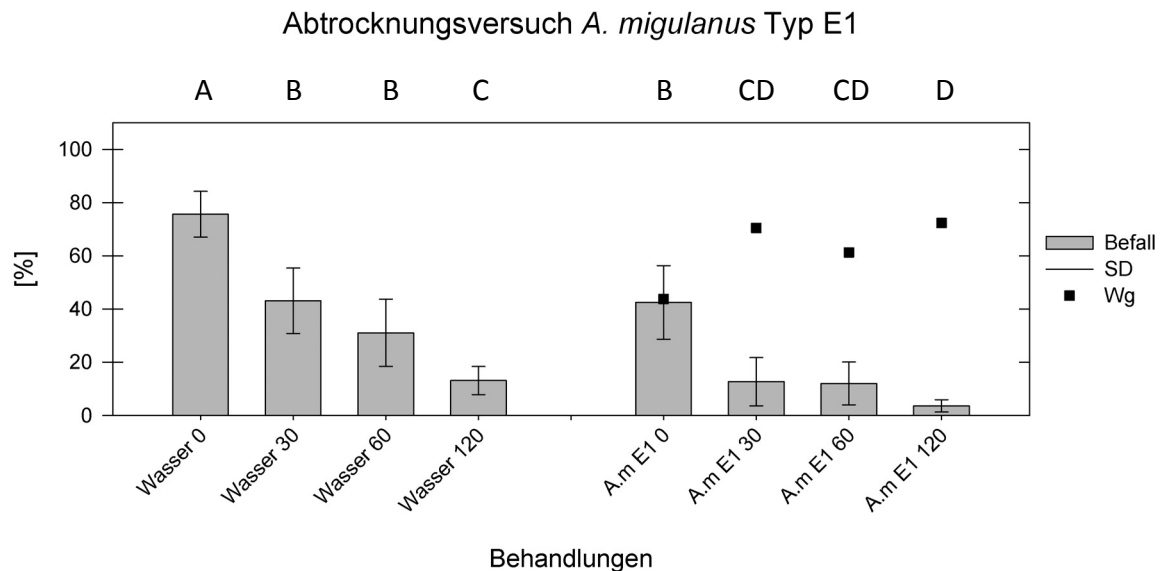


Abb. 3-11: Wirkung einer fünf Tage alten Gesamtkultur von *A. migulanus* Typ E1 auf den Befall mit *P. cubensis* an Gurke, wenn die Pflanzen nach der feuchten Inokulation mit *P. cubensis* verschieden lange abtrocknen konnten; Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ), Stabw. bedeutet SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

Tabelle 3-2: Vergleich der Wirkungsgrade bezogen auf den Befall nach den in Abb. 3-11 dargestellten Ergebnissen. Die errechneten Wirkungsgrade beziehen sich in A) auf die Wasserkontrolle der selben Abtrocknungszeit und in B) auf die Wasserkontrolle ohne Abtrocknungsdauer.

Varianten und Abtrocknungsdauer zw. Inokulation und Inkubation	Befall im Biotest	A) Wirkungsgrad gegen Wasser der gleichen Abtrocknungsdauer	B) Wirkungsgrad gegen Wasser $t = 0$ min
Wasser 0 min	75,63 %		
Wasser 30 min	43,13 %		42,98 %
Wasser 60 min	31,09 %		58,88 %
Wasser 120 min	13,13 %		82,64 %
A.m. E1 0 min	42,50 %	43,80 %	43,80 %
A.m. E1 30 min	12,72 %	70,51 %	83,18 %
A.m. E1 60 min	12,03 %	61,31 %	84,09 %
A.m. E1 120 min	3,63 %	72,38 %	95,21 %

### 3.1.6 Massenspektrometrie der Überstände von *A. migulanus* weiß und E1

Mittels einer semiquantitativen Massenspektrometrie wurde untersucht, ob *A. migulanus* einen messbaren Anteil von Gramicidin S in das umgebende Medium abgeben kann. Die Massenspektrometrie wurde von Herrn Dr. Schütze vom Julius Kühn-Institut in Quedlinburg durchgeführt. Er untersuchte das Spektrum von Gramicidin S, welches aus einer *A. migulanus* weiß Flüssigkultur isoliert wurde sowie die Überstände der Kulturen von *A. migulanus* weiß und E1 (Abb. 3-12 bis 3-14).

In allen Proben ließ sich Gramicidin S massenspektrometrisch nachweisen. Es war an einem Peak bei 1141,6 m/z und zwei weiteren typischen Peaks bei 1142,6 und 1143,5 m/z zu erkennen. Eine genaue Quantifizierung der Menge an Gramicidin S wurde nicht durchgeführt. Jedoch kann über die Höhe des Peaks bei gleicher Intensität eine Abschätzung vorgenommen werden. Die Höhe des Peaks der Gramicidin S-Extraktion von *A. migulanus* weiß lag bei einer relativen Intensität von 61400, während die peaks der Überstände von *A. migulanus* weiß und von E1 nur bei ca. 700 bzw. ca. 500 lagen. Danach wäre in den Überständen der Gehalt an Gramicidin S etwa 100 mal geringer. Diese im Gegensatz zur Gramicidin S-Probe sehr geringen Werte sind laut Dr. Schütze nahe der Nachweisgrenze und daher zu vernachlässigen (persönliche Mitteilung Dr. Schütze, 2012).

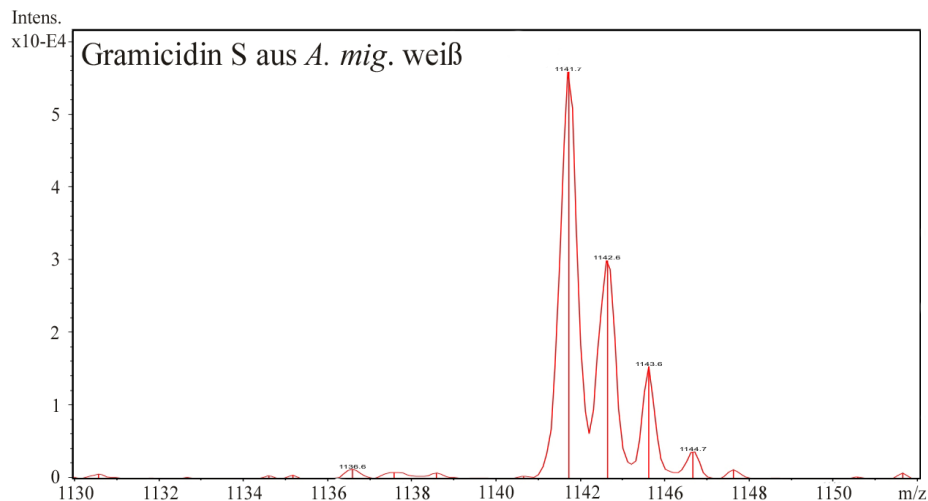


Abb. 3-12: Spektrogramm von Gramicidin S aus der ethanolischen Extraktion einer fünf Tage alten Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß (*A. mig. weiß*). Auf der x-Achse wurde das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) und auf der y-Achse die relative Intensität der Peaks aufgetragen.



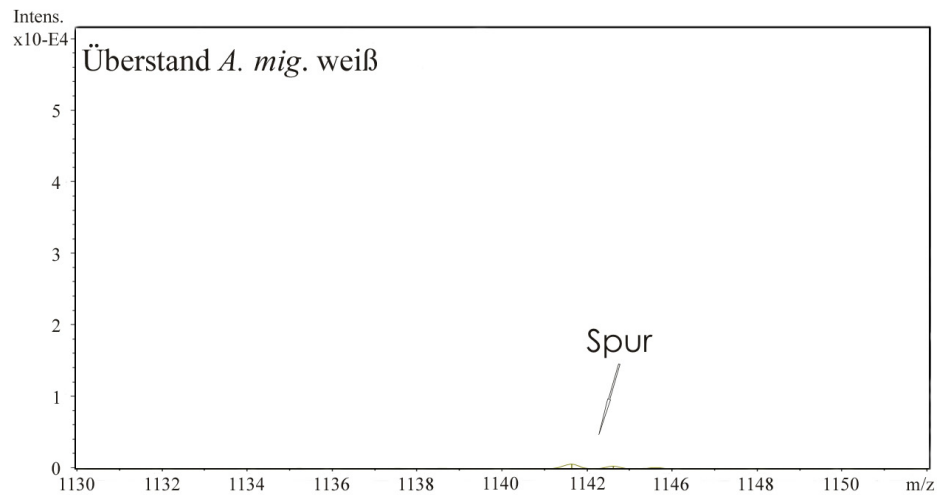


Abb. 3-13: Spektrogramm des Überstandes einer fünf Tage alten Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß (*A. mig. weiß*). Auf der x-Achse wurde das Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) und auf der y-Achse die relative Intensität der Peaks aufgetragen.

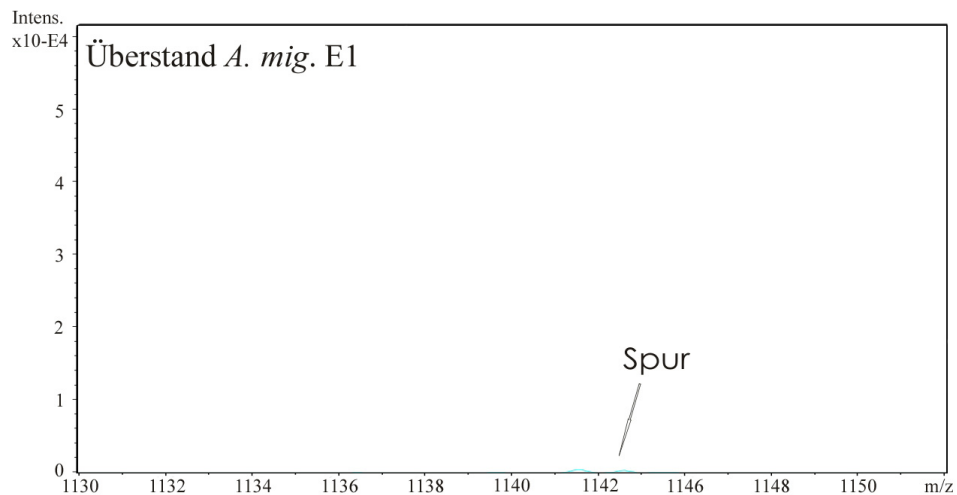


Abb.3-14: Spektrogramm des Überstandes einer fünf Tage alten Flüssigkultur von *A. migulanus* E1 (*A. mig. E1*). Auf der x-Achse wurde das Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) und auf der y-Achse die relative Intensität der Gramicidin S-Peaks aufgetragen.

### 3.1.7 Kombination des Pflanzenextraktes mit der Flüssigkultur

Durch die Kombinationen zweier unterschiedlich wirkender Pflanzenschutzmittel kann ihre Wirkung auf verschiedene Pathogene noch verbessert werden [SCHMITT & SEDDON 2005]. In diesem Versuch wurde die Kombinierbarkeit des Extraktes aus *M. cordata* mit der

Gesamtkulturbrühe sowie des Überstandes von *A. migulanus* weiß untersucht. Es wurden zwei Gurkenpflanzen je Variante in vier Wiederholungen verwendet (Abb. 3-15).

Durch die Kombination des Pflanzenextraktes aus *M. cordata* (50 µg/ml) mit der Gesamtkulturbrühe von *A. migulanus* (1:5 verdünnt) wurde die Wirkung von 69,62 bzw. 67,17 % auf 83,55 % leicht, aber nicht signifikant verbessert.

Die Mischung des Überstandes der Bakterienkulturbrühe (1:1 verdünnt) mit dem *M. cordata*-Extrakt (50 µg/ml) führte wiederum zu einer leichten Verbesserung der Wirkung beider Bestandteile. Sie stieg von 69,62 % (Pflanzenextrakt) bzw. 32,08 % (Überstand) auf 84,34 %. Nur gegenüber dem Überstand zeigte sich eine signifikante Befallsverringering.

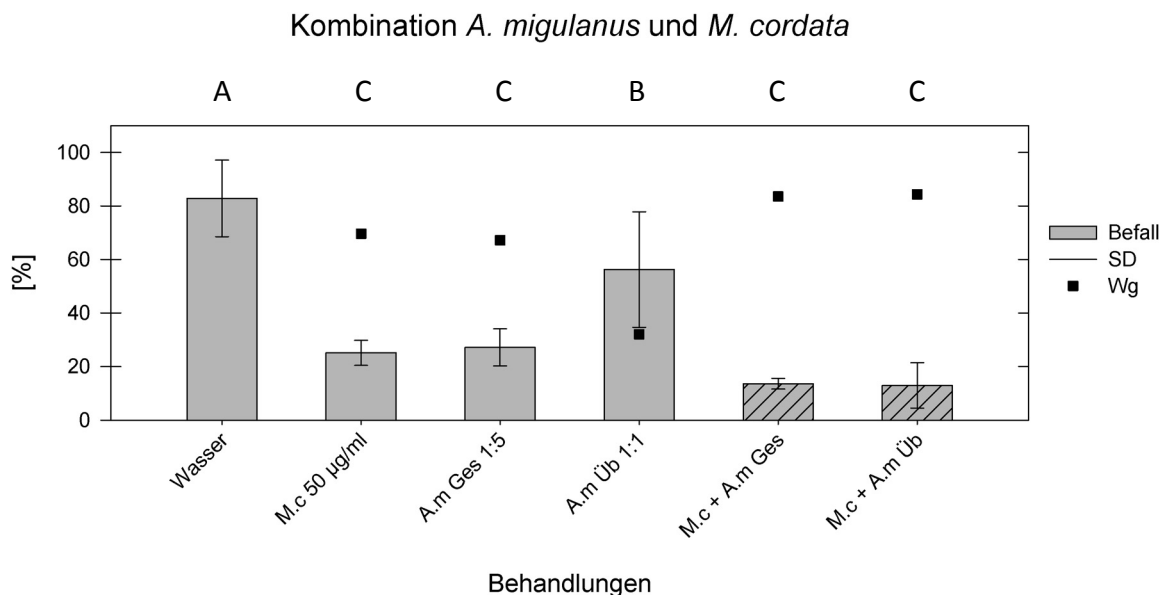


Abb. 3-15: Wirkung der Kombination eines Extraktes aus *M. cordata* (M.c) und einer fünf Tage alten Kultur von *A. migulanus* (A.mig) auf den Befall mit *P. cubensis* an Gurke. Die Pflanzen wurden mit dem Extrakt aus *M. cordata* in der Konzentration 50 µg/ml, einer 1:5 verdünnten Gesamtkultur von *A. migulanus* (A.m Ges 1:5) oder dem 1:1 verdünnten Überstand (A.mig Üb 1:1), bzw. mit einer Mischung aus *A. migulanus* und *M. cordata* behandelt; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ), SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

### 3.1.8 Abhängigkeit der Wirkung von *A. migulanus* weiß vom Gramicidin S Gehalt

#### 3.1.8.1 Gramicidinbestimmung von *A. migulanus* weiß aus Versuch 3.1.1

Zur Bestimmung des Gramicidingehaltes der Flüssigkulturen von *A. migulanus* weiß aus Versuch 3.1.1 (Abb. 3-3) wurde ein Hemmhoftest mit *Micrococcus luteus* durchgeführt. Die Standardgerade wurde mit reinem Gramicidin S (Sigma) erstellt (Abb. A-2). Für den Versuch ergab sich folgende Geradengleichung:

$$y = 131,4 \cdot \log(x) - 118,2; R^2 = 0,953$$

y = Hemmhof in mm<sup>2</sup>

x = Gramicidingehalt

In Tabelle 3-3 wurde beispielhaft eine Berechnung des Gramicidingehaltes anhand der Standardkurve dargestellt. Es zeigte sich, dass die Werte sich in ihrer Endkonzentration je nach Verdünnung stark unterschieden. So ließ sich aus der unverdünnten Kultur ein Gramicidingehalt von 534,48 µg/ml ermitteln. Je stärker die Kultur verdünnt wurde, desto größer war die Menge an Gramicidin S, die sich errechnen ließ. In der 1:10 verdünnten Kultur betrug er 1240,89 µg/ml, was einem Faktor von 2,3 zur unverdünnten Kultur entsprach. Dieses Phänomen soll in der Diskussion erörtert werden.

Für alle weiteren Gramicidinbestimmungen wurde jeweils die Menge als Gramicidinkonzentration herangezogen, welche sich aus der größten Verdünnungsstufe errechnen ließ, in der auf der Agarplatte noch ein Hemmhof messbar war.

Tab. 3-3: Beispielrechnung zur Bestimmung von Gramicidin S für die unverdünnte Kultur von *A. migulanus* weiß nach fünf Tagen Fermentation. Die Gramicidinberechnung basierte auf den Mittelwerten aus dem Hemmhoftest, bei dem verschiedene Verdünnungen zugrunde lagen. res GS = der errechnete Gramicingehalt unter Einbezug der jeweiligen Verdünnung.

Verdünnung Probe	Hemmhof [mm]	y [mm <sup>2</sup> ]	log x	res. GS [µg/ml]
1:100	9,00	81,00	1,52	0
1:10	10,83	117,39	1,79	1240,89
1:5	12,00	144,00	2,00	989,54
1:1	13,00	169,00	2,19	613,41
unverdünnt	14,17	200,69	2,43	534,48
Kontrolle	9,00	81,00	1,52	0

Die für die Verdünnungsreihe der *A. migulanus* weiß Flüssigkultur (Abb. 3-3) errechneten Werte wurden in Abb. 3-16 graphisch aufgetragen. In der unverdünnten Kultur (100 %) betrug der Gramacidin Gehalt 1240,9 µg/ml, in der 1:1 Verdünnung (50 %) waren es 457,7 µg/ml und in der 1:3 Verdünnung (33 %) 206,17 µg/ml. In den Verdünnungen 1:5 und 1:10 lag der Gramacidin Gehalt etwa bei 200 µg/ml. Hier war die Bestimmungsgrenze erreicht. Abbildung 3-16 zeigt, dass es oberhalb der Bestimmungsgrenze von der unverdünnten zur 1:3 verdünnten Kultur einen linearen Zusammenhang zwischen Verdünnung und Gramacidin Gehalt von *A. migulanus* weiß gibt.

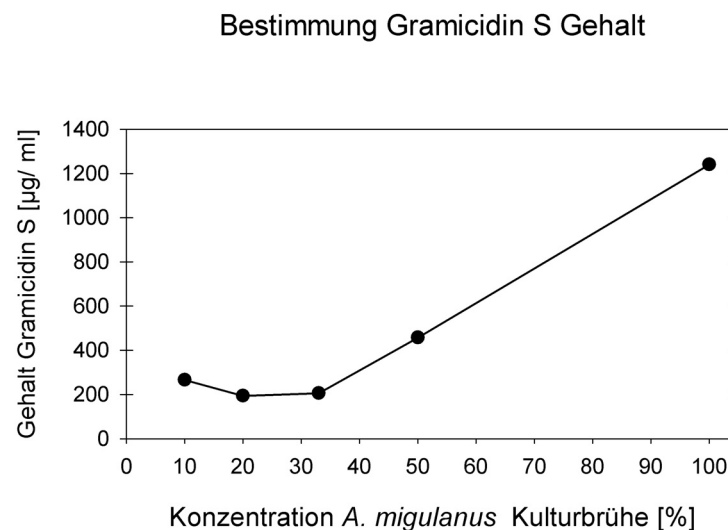


Abb. 3-16: Bestimmung der Gramacidin Gehalte der Proben aus der Verdünnungsreihe mit *A. migulanus* Kulturbrühe (s. Abb. 3-3) mittels Hemmhoftest.

### 3.1.8.2 Abhängigkeit des Wirkungsgrades vom Gramacidin Gehalt

Der Vergleich des Gramacidin Gehaltes mit dem Wirkungsgrad im Biotest an Gurken (Abb. 3-17) zeigte, dass mit der Kulturbrühe von *A. migulanus* weiß mit einem aus dem Hemmhoftest ermittelten Gramacidin Gehalt von etwa 200 µg/ml ein sehr hoher Wirkungsgrad von etwa 87 % erzielt werden kann. Um einen solchen Wirkungsgrad (etwa 85 %) mit reinem Gramacidin S zu erzielen, waren im Biotest 500 µg/ml notwendig (s. Abb. 3-3 und 3-4).

Da die Nachweisgrenze des Hemmhoftestes bei etwa 200 µg/ml Gramacidin S lag (s. Abb. 3-16), wurden die Gramacidin Gehalte ausgehend von der Höchstkonzentration (1240 µg/ml) und der eingesetzten Konzentration der *A. migulanus* Kultur errechnet. Die erhaltenen Werte wurden ebenfalls mit den Wirkungsgraden in Bezug gesetzt. Hier zeigte sich, dass in den

hohen Konzentrationen über 200  $\mu\text{g/ml}$  die Wirkung ähnlich mit der des reinen Gramicidin S war. In den niedrigeren Konzentrationen verläuft die Kurve des reinen Gramicidins etwas flacher als die der *A. migulanus* Kultur (Abb. 3-17, *A. migulanus* ber.). Das bedeutet, dass reines Gramicidin S in einer höheren Konzentration verwendet werden musste, um den gleichen Wirkungsgrad wie mit *A. migulanus* Kultur zu erhalten.

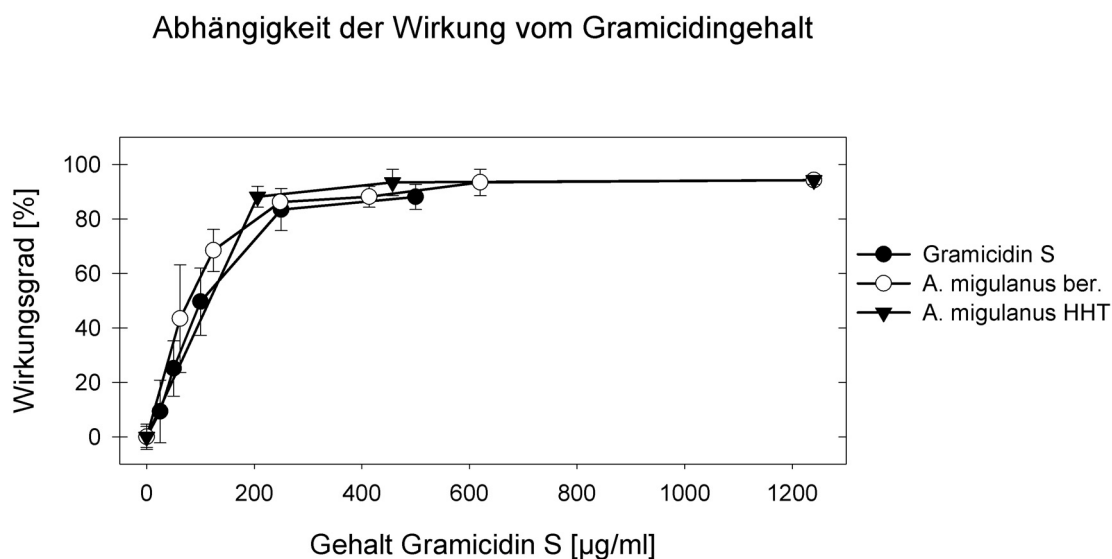


Abb. 3-17: Abhängigkeit des Wirkungsgrades vom Gehalt an Gramicidin S im Präparat. Gurkenpflanzen wurden entweder mit verschiedenen Verdünnungen einer Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß oder mit reinem Gramicidin S behandelt. *A. migulanus* ber. setzt die von 1240  $\mu\text{g/ml}$  als Höchstwert berechneten Gramicidingehalte in Bezug zu den Wirkungsgtaden aus dem Biotest (Abb. 3-3). *A. migulanus* HHT bezeichnet die Gramicidingehalte, welche im Hemmhoftest ermittelt wurden (Abb. 3-16). Gramicin S setzt die Daten aus dem Biotest in Abb. 3-4 in Bezug.

### 3.1.9 Einfluss der Präparate auf die $\text{H}_2\text{O}_2$ Bildung in Gurkenpflanzen

#### 3.1.9.1 $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung an Blattscheiben

Wasserstoffperoxid ist eines der Signalmoleküle, welches von Pflanzen bei Stress z.B. durch Pathogenbefall oder Verwundung gebildet wird [MÜLLER 2002]. Mit Hilfe von 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) kann  $\text{H}_2\text{O}_2$  histologisch nachgewiesen werden. Dabei polymerisiert DAB in Anwesenheit von Enzymen, die im Zusammenhang mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  auftreten (Peroxidase, Catalase) zu einem braunen, unlöslichen Polymer [THORDAL-CHRISTENSEN et al. 1997].

---

In diesem Versuch sollte mittels histologischem Wasserstoffperoxidnachweis geprüft werden, ob der Extrakt aus *M. cordata* oder die Bakterienkultur von *A. migulanus* einen Anstieg von  $H_2O_2$  im pflanzlichen Gewebe bewirken.

In einem ersten Versuch wurden der Extrakt aus *M. cordata* (50  $\mu\text{g/ml}$ ) und die Bakterienkultur von *A. migulanus* (Typ weiß und E1) in einer 1:1 Verdünnung getestet (Abb. 3-18). In einem zweiten Versuch (Abb. 3-19) wurden die Komponenten der Bakterienkultur einzeln sowie reines Gramacidin S (500  $\mu\text{g/ml}$ ) und TSB-Medium 1:1 verdünnt geprüft. Als Kontrolle diente in beiden Versuchen Wasser. Die Blattscheiben wurden ca. 10 min, 4, 5, 6, 7, 8 oder 24 h in der jeweiligen Testlösung inkubiert und anschließend durch optische Begutachtung der Blattscheiben ausgewertet.

Der erste Versuch (Abb. 3-18) zeigte, dass bei der Behandlung der Blattscheiben mit dem Extrakt aus *M. cordata*  $H_2O_2$  gebildet wurde. Die Blattscheiben waren im Vergleich mit der Wasserkontrolle ein wenig dunkler und rötlich braune Stellen wurden sichtbar.

Die Behandlung der Blattscheiben mit *A. migulanus* (Typ weiß oder E1) führte zu einer starken Bildung von DAB-Polymeren bereits 4 h nach Inkubationsbeginn (Abb. 3-18). Die Untersuchung der einzelnen Bestandteile der Bakterienkultur im zweiten Versuch (Abb. 3-19) zeigte, dass die starke Reaktion und damit die Bildung des  $H_2O_2$  vorwiegend vom Überstand der Kulturen herrührte. Hier gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Bakterientypen weiß oder E1.

Die Blattscheiben, die mit einer Zellsuspension der Bakterientypen (weiß oder E1) behandelt wurden, zeigten jedoch Unterschiede zueinander. Diejenigen, die mit dem *A. migulanus* Typ weiß behandelt wurden, bildeten rotbraune Polymere, welche in der Ausprägung vergleichbar waren mit den mit Gramacidin S behandelten Blattscheiben. Jedoch war die Reaktion nicht annähernd so stark, wie nach der Behandlung mit dem Überstand beider Varianten von *A. migulanus*. Blattscheiben, welche in E1-Zellsuspension eingelegt waren, reagierten nur schwach und blieben nahezu farblos.

Alle Blattscheiben, die zur Kontrolle in Wasser oder TSB eingelegt wurden, waren nach der Chlorophyllextraktion fast farblos.

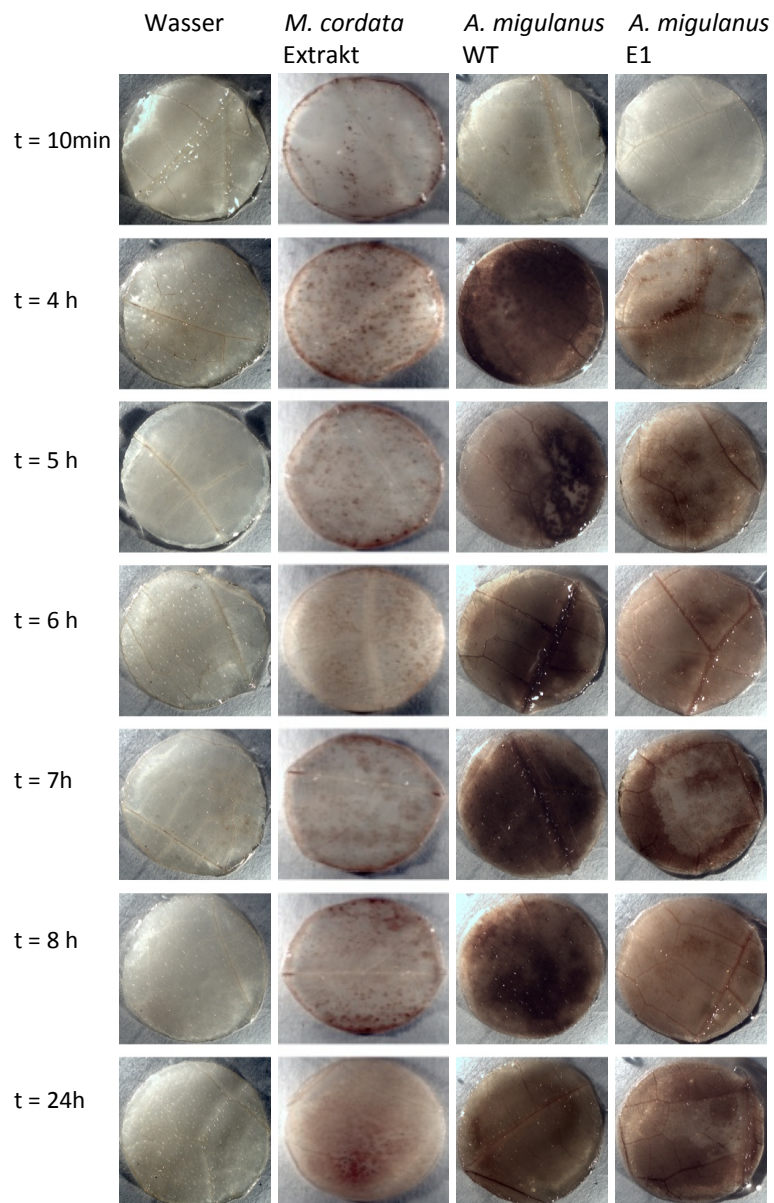


Abb. 3-18: Nachweis von  $H_2O_2$ -Bildung in Blattscheiben von *C. sativus* nach Behandlung mit Wasser, *M. cordata* Extrakt (50  $\mu g/ml$ ) oder *A. migulanus* WT Flüssigkultur (1:1) mittels DAB Färbung. Blattscheiben wurden 10 min – 24 h in der Lösung belassen, anschließend in 1mg/ ml DAB inkubiert und danach entfärbt.



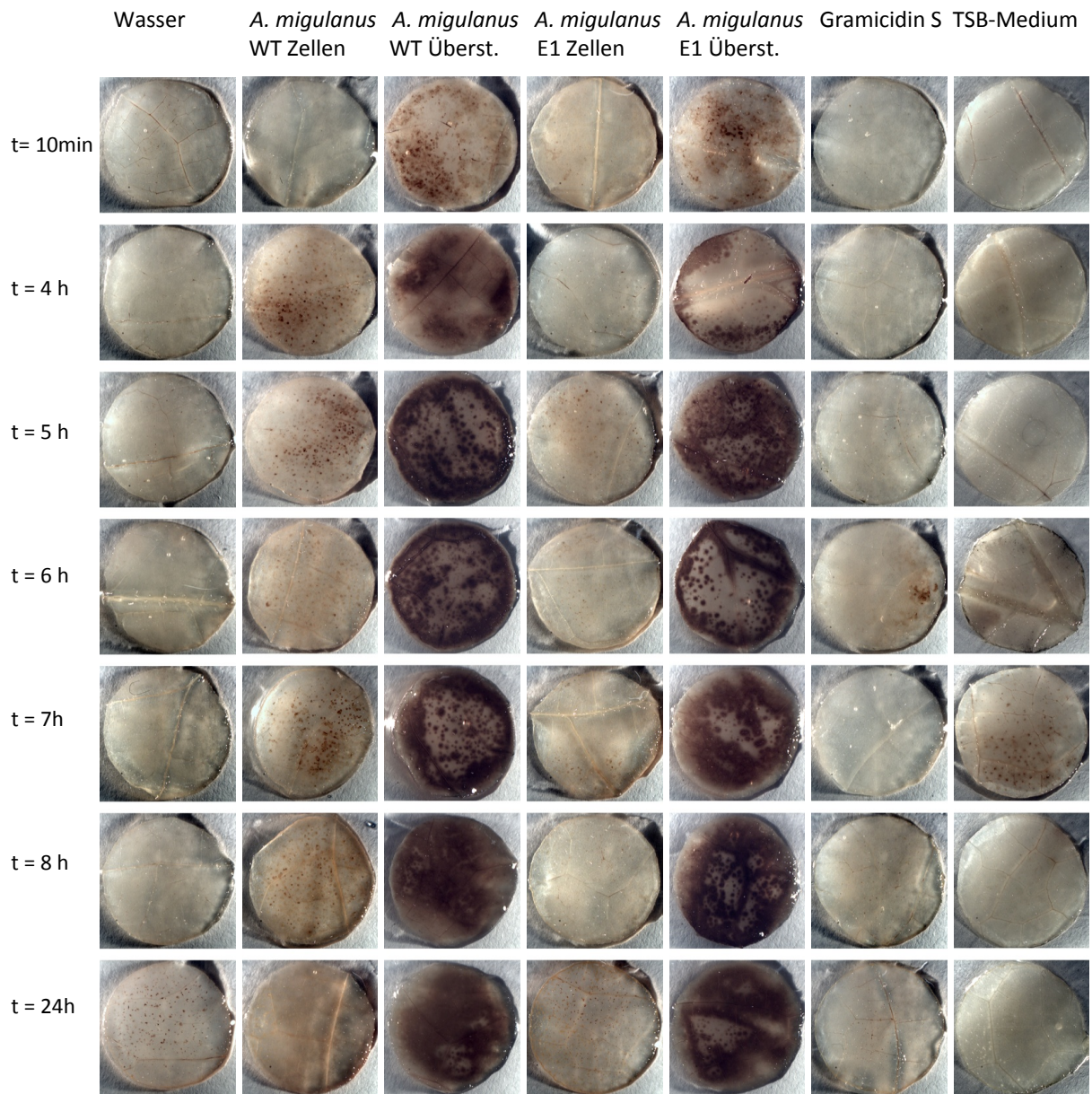


Abb. 3-19: Nachweis von  $H_2O_2$ -Bildung in Blattscheiben von *C. sativus* nach Behandlung mit Wasser, *A. migulanus* Wildtyp Zellsuspension (WT Zellen), *A. migulanus* Wildtyp Überstand (WT Überst.), *A. migulanus* E1 Zellsuspension (E1 Zellen), *A. migulanus* E1 Überstand (E1 Überst.), Gramicidin S (500  $\mu$ g/ml) oder TSB-Medium (1:1) mittels DAB Färbung. Blattscheiben wurden 10 min – 24 h in der Lösung belassen, anschließend in 1mg/ ml DAB inkubiert und danach entfärbt.



---

### 3.1.9.2 Phytotoxische Wirkung der Präparate an Blattscheiben

Um zu untersuchen, ob die DAB-Polymere, welche durch den Überstand der Kultur von *A. migulanus* und den Extrakt aus *M. cordata* gebildet werden, von einer phytotoxischen Reaktion herrührten, wurden Blattscheiben 10 min oder 4 h in den Suspensionen inkubiert und anschließend auf Wasseragar ausgelegt. Zur Kontrolle wurden ganze Pflanzen mit den Präparaten eingesprüht und am darauffolgenden Tag ebenfalls als Blattscheiben auf Wasseragar ausgelegt. Die visuelle Auswertung der Blattscheiben erfolgte einen und zwei Tage nach Auflegen. Es wurden exemplarisch 3 von 6 Blattscheiben fotografisch dokumentiert.

An den mit Wasser behandelten Blattscheiben (Abb. 3-20) wurden weder in der besprühten noch in der getauchten Variante Veränderungen sichtbar. Auch am zweiten Tag nach Behandlung zeigten sich keine Schädigungen am Blattgewebe.

Die 10minütige Inkubation der Blattscheiben in *M. cordata* Extrakt (50 µg/ml, Abb. 3-21) führte zur Auflösung von Blattgewebe, die am zweiten Tag zunahm. Auf den Blattscheiben, welche 4 h in den Lösungen inkubiert wurden, waren bereits direkt nach Entnahme aus den Lösungen Veränderungen zu sehen, die sich mit der Zeit verstärkten. Die Sprühapplikation des Extraktes auf ganze Pflanzen führte jedoch nicht zu einer Auflösung von Blattgewebe.

Wurden Blattscheiben 10 min in die Kulturbrühe von *A. migulanus* weiß (Abb. 3-22), eine Zellsuspension von *A. migulanus* (Abb. 3-23) oder in *A. migulanus* Überstand (Abb. 3-24) getaucht, so waren auch nach zwei Tagen keine Veränderungen am Blattgewebe sichtbar. Nach der 4stündigen Tauchbehandlung waren die Zellveränderungen schon nach einem Tag bei *A. migulanus* Gesamtkultur und Überstand besonders stark, wogegen sich bei den Varianten *A. migulanus* Zellsuspension erst am zweiten Tag deutliche Schäden zeigten. Auch bei diesen Varianten hatte die Sprühapplikation der Präparate keine gewebeauflösende Wirkung.

Die Tauchbehandlung der Blattscheiben in Gramicidin S (Abb. 3-25) führte zu einem ähnlichen Ergebnis wie die Behandlung mit der *A. migulanus* Zellsuspension. Ein 10minütiges Tauchen hatte keinen Einfluss auf das Blattgewebe. Das 4stündige Belassen der Blattscheiben in der Lösung führte zu Zersetzungen des Blattgewebes, die nach zwei Tagen sichtbar wurden.

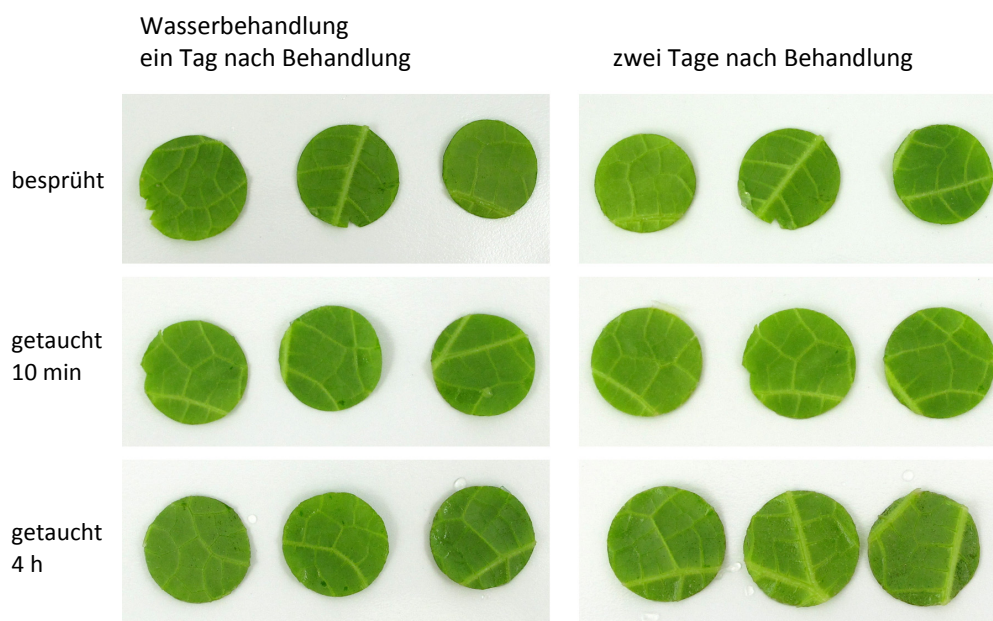


Abb. 3-20: Phytotoxische Wirkung einer Wasserbehandlung auf *C. sativus*. Es wurden Ganzpflanzen besprüht und nach einem Tag Blattscheiben ausgestanzt (besprüht) oder es wurden Blattscheiben ausgestanzt und für 10 min (getaucht 10 min) oder für 4 h (getaucht 4 h) eingelegt und auf den Agar aufgelegt.

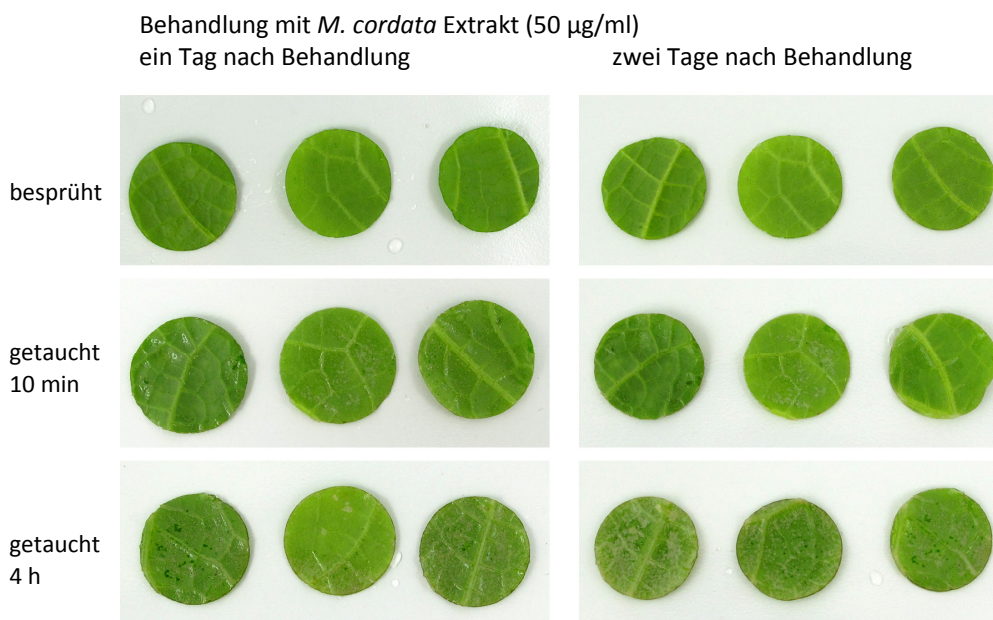


Abb. 3-21: Phytotoxische Wirkung einer Behandlung mit dem Extrakt aus *M. cordata* (50 µg/ml) auf *C. sativus*. Es wurden Ganzpflanzen besprüht und nach einem Tag Blattscheiben ausgestanzt (besprüht) oder es wurden Blattscheiben ausgestanzt und für 10 min (getaucht 10 min) oder für 4 h (getaucht 4 h) eingelegt und auf den Agar aufgelegt.

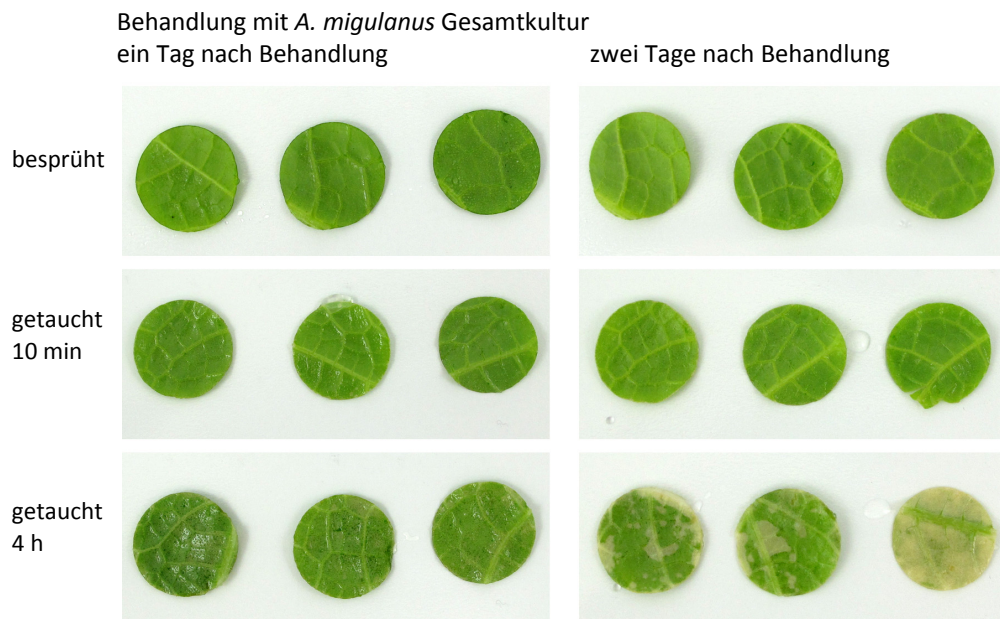


Abb. 3-22: Phytotoxische Wirkung einer Behandlung mit der Gesamtkulturbrühe von *A. migulanus* weiß (1:1) auf *C. sativus*. Es wurden Ganzpflanzen besprüht und nach einem Tag Blattscheiben ausgestanzt (besprüht) oder es wurden Blattscheiben ausgestanzt und für 10 min (getaucht 10 min) oder für 4 h (getaucht 4 h) eingelegt und auf den Agar aufgelegt.



Abb. 3-23: Phytotoxische Wirkung einer Behandlung mit der Zellsuspension einer *A. migulanus* weiß Flüssigkultur (1:1) auf *C. sativus*. Es wurden Ganzpflanzen besprüht und nach einem Tag Blattscheiben ausgestanzt (besprüht) oder es wurden Blattscheiben ausgestanzt und für 10 min (getaucht 10 min) oder für 4 h (getaucht 4 h) eingelegt und auf den Agar aufgelegt.



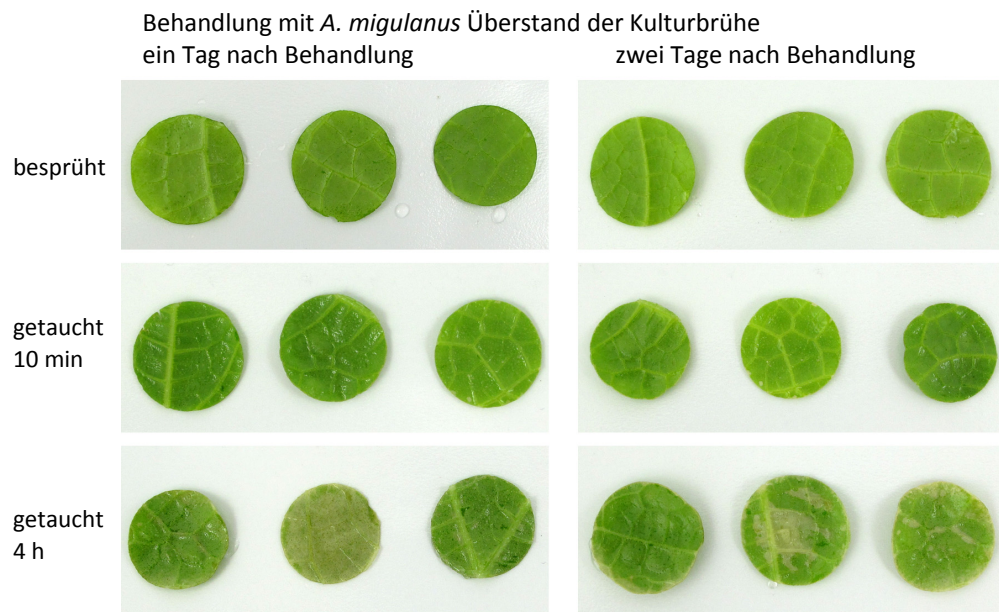


Abb. 3-24: Phytotoxische Wirkung einer Behandlung mit dem Überstand der Kulturbrühe einer *A. migulanus* weiß Flüssigkultur (1:1) auf *C. sativus*. Es wurden Ganzpflanzen besprüht und nach einem Tag Blattscheiben ausgestanzt (besprüht) oder es wurden Blattscheiben ausgestanzt und für 10 min (getaucht 10 min) oder für 4 h (getaucht 4 h) eingelegt und auf den Agar aufgelegt.

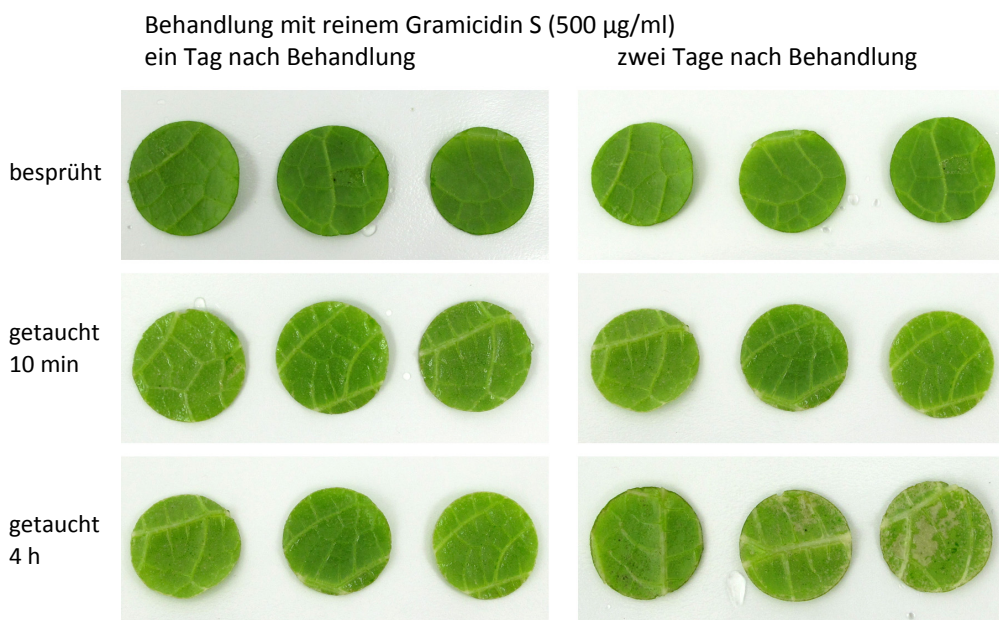


Abb. 3-25: Phytotoxische Wirkung einer Behandlung mit Gramicidin S (500 µg/ml) auf *C. sativus*. Es wurden Ganzpflanzen besprüht und nach einem Tag Blattscheiben ausgestanzt (besprüht) oder es wurden Blattscheiben ausgestanzt und für 10 min (getaucht 10 min) oder für 4 h (getaucht 4 h) eingelegt und auf den Agar aufgelegt.

---

### 3.1.9.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung bei Behandlung von Ganzpflanzen

In diesem Versuch wurden die Präparate beidseitig auf die Pflanzen aufgesprüht und nach 10 min, drei Stunden oder einem Tag mit DAB behandelt. Abb. 3-26 zeigt die Blattscheiben nach Chlorophyllextraktion.

Es zeigte sich, dass die Gurkenpflanzen, wenn sie als Ganzes mit den Präparaten behandelt wurden, nicht so stark reagierten, wie die in den Lösungen inkubierten Blattscheiben (siehe Abb. 3-18 und 3-19). Nach der Behandlung mit DAB waren die braunen Polymere nur schwach ausgeprägt. Problematisch war hier, dass die mit Wasser behandelten Pflanzen nach der Chlorophyllextraktion einen leichten braunen Farbton behielten und die Reaktion auf die Behandlungen innerhalb einer Variante stark variieren konnten.

Wurden die Pflanzen mit Wasser oder TSB-Medium behandelt, zeigte sich keine Zunahme der Braunfärbung über die Zeit. Auch nach Behandlung mit *M. cordata* Extrakt und Gramicidin S waren keine Veränderungen im Vergleich zur Wasserkontrolle zu sehen. Nur die Behandlung mit den *A. migulanus* Präparaten bewirkte eine leichte Zunahme der Bildung von Polymeren. Jedoch waren auch hier Blattscheiben zu finden, deren Färbung weniger stark ausfiel.

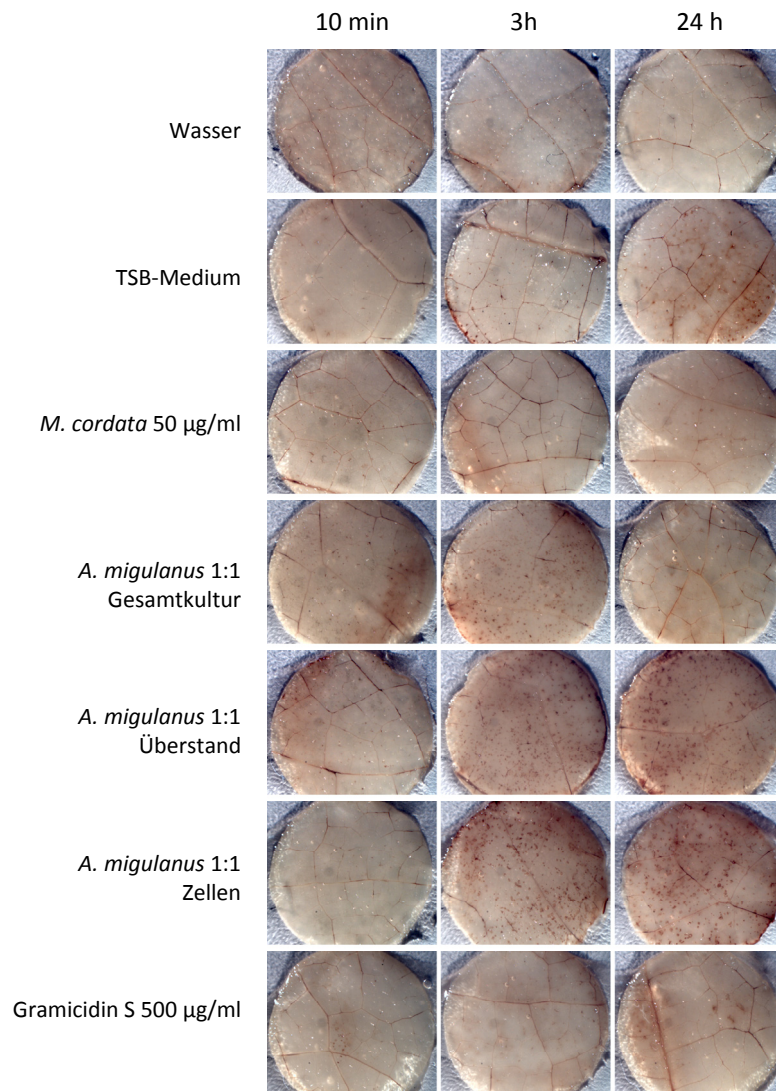


Abb. 3-26: Nachweis von  $H_2O_2$ -Bildung in Blattscheiben von *C. sativus* nach Behandlung mit Wasser, TSB-Medium (1:1 verdünnt), *M. cordata* (50 µg/ml), *A. migulanus* weiß Gesamtkultur, *A. migulanus* weiß Überstand, *A. migulanus* weiß Zellsuspension, Gramicidin S (500 µg/ml) mittels DAB Färbung. Es wurden Ganzpflanzen von *C. sativus* behandelt, Blattscheiben nach 10 min, 3h oder 24 h ausgestanzt und in DAB inkubiert. Beispielhafte Darstellung von je einer Blattscheibe pro Zeit von 10.

---

### 3.1.10 Wirkung auf Oomyceten

#### 3.1.10.1 Einfluss auf das Myzelwachstum von *P. infestans*

Die Wirkungen von Gramicidin S bzw. dem Extrakt aus *M. cordata* auf das Wachstumsverhalten des Oomyceten *P. infestans* wurde auf Gemüsesaft-Agar überprüft (Abb. 3-27 und 3-28). In den geringsten Konzentrationen von 1 – 10 µg/ml hatte Gramicidin S keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum des Pilzes. Nach 14 Tagen erreichte der Pilz den maximalen Radius der Petrischale. Mit einer Konzentration von 100 µg/ml Gramicidin S ließ sich das Wachstum stark verlangsamen, so dass der Pilz nach 14 Tagen nur einen Radius von 0,63 cm hatte. Das Wachstum wurde jedoch nicht vollständig gehemmt. Eine Kontrolle zeigte nach 30 Tagen, dass der Pilz weiter gewachsen war. Der Einsatz der hohen Konzentrationen von Gramicidin S (25 – 100 µg/ml) führte nach 14 Tagen zu einer signifikant geringeren Ausbreitung des Pilzes auf dem Nährmedium.

Mit der Konzentration von 1 µg/ml wurde beim Einsatz des Extraktes aus *M. cordata* keine Verzögerung des Wachstums beobachtet. Mit 10 µg/ml kam es zu einer leichten Verzögerung des Pilzwachstums. Das Myzelwachstum wurde durch die Erhöhung der Extraktkonzentration leicht verlangsamt. Wurden 100 µg/ml des Extraktes eingesetzt, wurde das Pilzwachstum vollständig gehemmt. Auch das auf den Agar aufgesetzte Myzelstückchen war frei von Pilzgewebe. Auch hier zeigte sich nach 14 Tagen Wachstum ein signifikant geringeres Wachstum des Pilzes, wenn hohe Konzentrationen (25 – 100 µg/ml) des Pflanzenextraktes in das Medium eingearbeitet wurden.

### Wirkung von Gramicidin S auf *P. infestans*

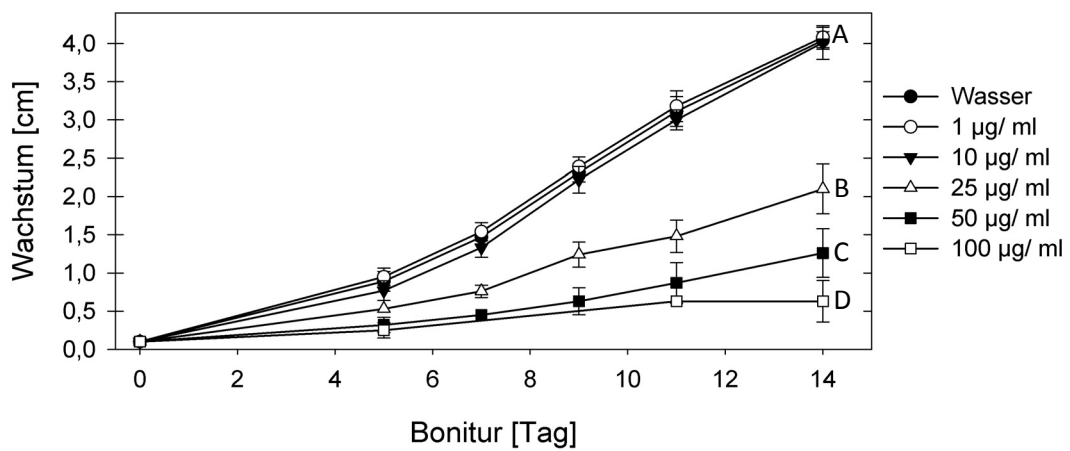


Abb. 3-27: Wirkung von Gramicidin S in verschiedenen Konzentrationen auf das Myzelwachstum von *P. infestans* auf Gemüsesaft-Medium, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ).

### Wirkung von *M. cordata* auf *P. infestans*

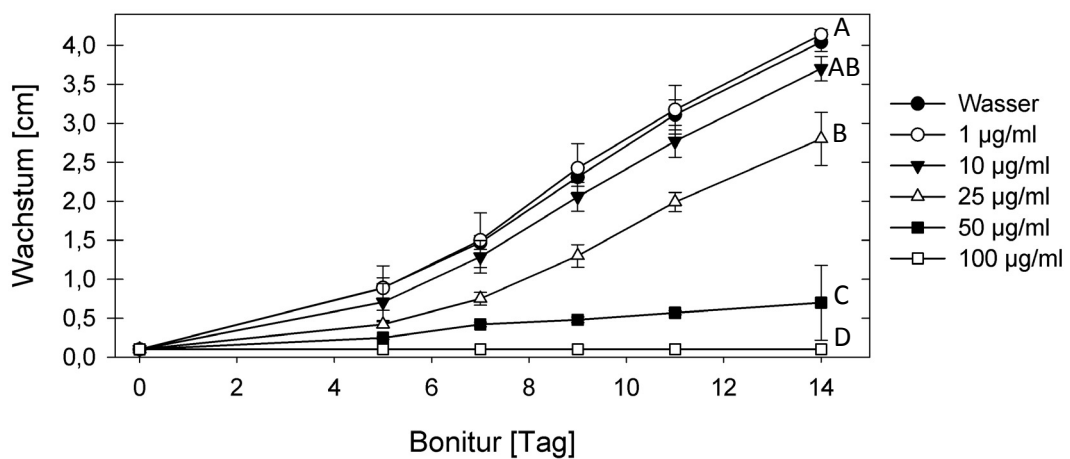


Abb. 3-28: Wirkung von einem Extrakt aus *M. cordata* in verschiedenen Konzentrationen auf das Myzelwachstum von *P. infestans* auf Gemüsesaft-Medium, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ).



---

### 3.1.10.2 Einfluss auf den Zoosporenschlupf und die Zoosporen von *P. infestans*

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die zu untersuchenden Präparate einen Einfluss auf den Schlupf der Zoosporen von *P. infestans* haben. Sporangien wurden in die jeweilige Testlösung gegeben, wurden stündlich (3 x 100 Sporangien) ausgezählt und in voll oder entleert klassifiziert.

Der Schlupf der Zoosporen aus den Sporangien in der Wasserkontrolle verlief sehr schnell und nach sechs Stunden waren 38,7 % der Sporangien entleert (Abb. 3-29). Bei den Varianten *A. migulanus* weiß Gesamtkultur und Überstand war eine fast 100 %ige Hemmung des Schlupfverhaltens zu beobachten. Durch 1:1 verdünntes TSB Medium wurde der Schlupf der Zoosporen teilweise gehemmt. Die Schlupfrate betrug nach sechs Stunden 11,7 % und lag zwischen der Wasserkontrolle und den *A. migulanus* Varianten. Nach sieben Stunden zeigte sich, dass die Bakterienkultur sowie der Überstand zu einer signifikant geringeren Schlupfrate führten. Aber auch das TSB-Medium verringerte den Schlupf signifikant verglichen mit der Wasserkontrolle.

Der Extrakt aus *M. cordata* (Abb. 3-30) hemmte den Schlupf der Zoosporen von *P. infestans* sehr wirksam. Während in der Wasserkontrolle nach drei Stunden 34,0 % der Sporangien entleert waren, waren es in der niedrigsten Konzentration (6 µg/ml) nur 3,3 %.

Alle Behandlungen mit dem Pflanzenextrakt führten nach drei Stunden Behandlungsdauer zu einer signifikanten Verringerung des Zoosporenschlupfes verglichen mit der Wasserkontrolle.

### Zoosporenschlupf mit *P. infestans*

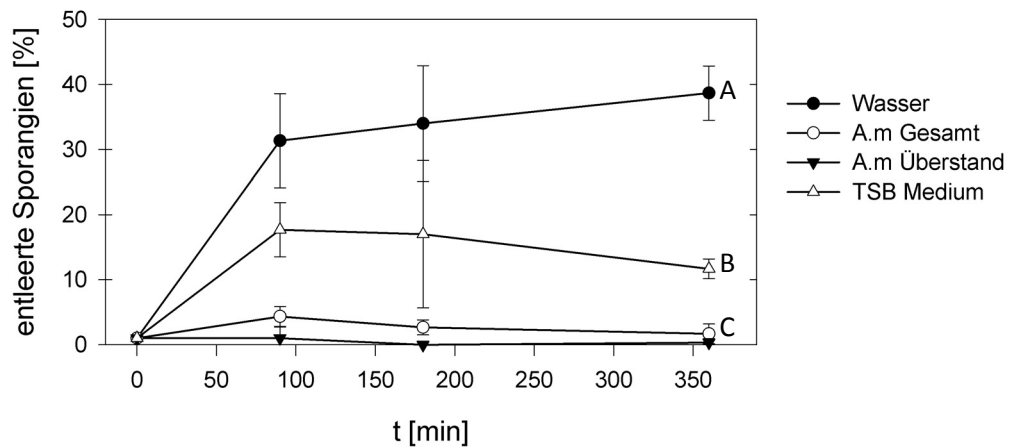


Abb. 3-29: Einfluss der Gesamtkulturbrühe und des Überstandes von *A. migulanus* (A.m 1:1 verdünnt) und von TSB-Medium (1:1 verdünnt) auf die Zoosporenentlassung bei *P. infestans* über einen Zeitraum von sechs Stunden, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ).

### Zoosporenschlupf mit *P. infestans*

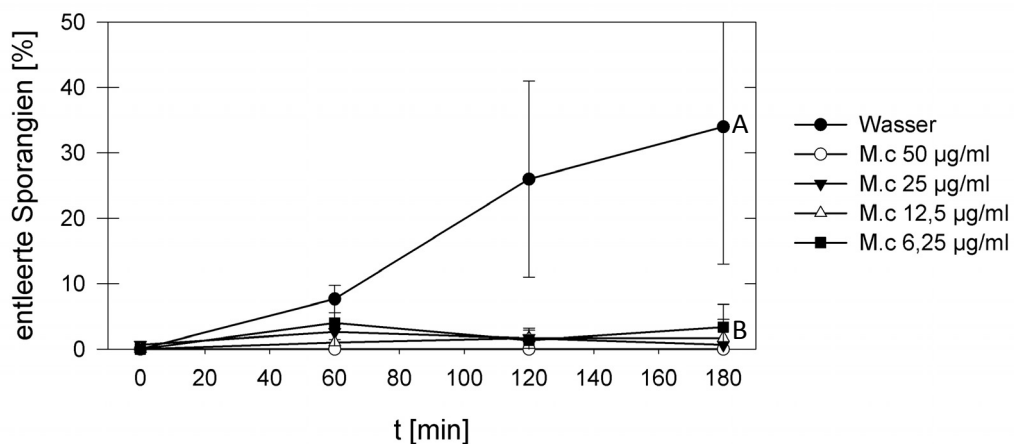


Abb. 3-30: Einfluss verschiedener Konzentrationen eines Extraktes aus *M. cordata* (6 - 50 µg/ml) auf die Zoosporenentlassung bei *P. infestans* über einen Zeitraum von drei Stunden, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ).

In einem Test auf Objektträgern wurde zu einer Lösung mit frisch geschlüpften Zoosporen von *P. infestans* das jeweilige Präparat von der Seite aufgetropft. Die Präparate waren TSB-Medium, die Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß und ihre Bestandteile (Zellen, Überstand),

---

reines Gramicidin S (100 µg/ml) und der *M. cordata*-Extrakt (50 µg/ml). Es zeigte sich, dass die meisten Präparate zu einem sofortigen Absterben der Zoosporen führten. Sobald sie mit dem jeweiligen Präparat in Berührung kamen, stellten die Zoosporen die Schwimmbewegungen ein, rundeten sich ab und lösten sich danach langsam auf (Abb. 3-31). Wurden die gewaschenen Zellen der Flüssigkultur von *A. migulanus* zu den Zoosporen gegeben, so konnten sie darin noch für einen längeren Zeitraum schwimmen und starben nicht sofort ab. Jedoch kam es auch hier zum Sterben der Zoosporen.



Abb. 3-31: Beispiel für die Wirkung der Präparate (hier *M. cordata*-Extrakt) auf die Zoosporen von *P. infestans* von links nach rechts mit ansteigender Zeit, Balken = 15 µm.

#### 3.1.10.3 Keimungstest auf Blattscheiben

In diesem Versuch wurde die Wirkung auf den Zoosporenschlupf bzw. die Sporenkeimung von *P. cubensis* auf Blattscheiben mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die Blattscheiben wurden, wie in 2.2.9.3 beschrieben, mit den verschiedenen Testsubstanzen behandelt. Dazu gehörten *M. cordata*-Extrakt (50 µg/ml), Zellen, Überstand und Gesamtkultur von *A. migulanus* weiß (1:1 verdünnt), Gramicidin S (500 µg/ml) und Wasser als Kontrolle.

Einen Tag nach der Inokulation waren in allen Varianten die Sporangien entleert (Abb. 3-32). Jedoch nur auf der Wasserkontrolle (Abb. 3-32 A) und den Blattscheiben, die mit dem Überstand der Bakterienkultur (Abb. 3-32 F) behandelt wurden, konnten ausgekeimte Zoosporen gefunden werden. In den anderen Varianten waren zum Teil geschlüpfte und vermutlich auch enzystierte (nicht feststellbar) Sporangien auf den Blattscheiben zu sehen. Aus ihnen wuchsen jedoch keine Keimschläuche aus.

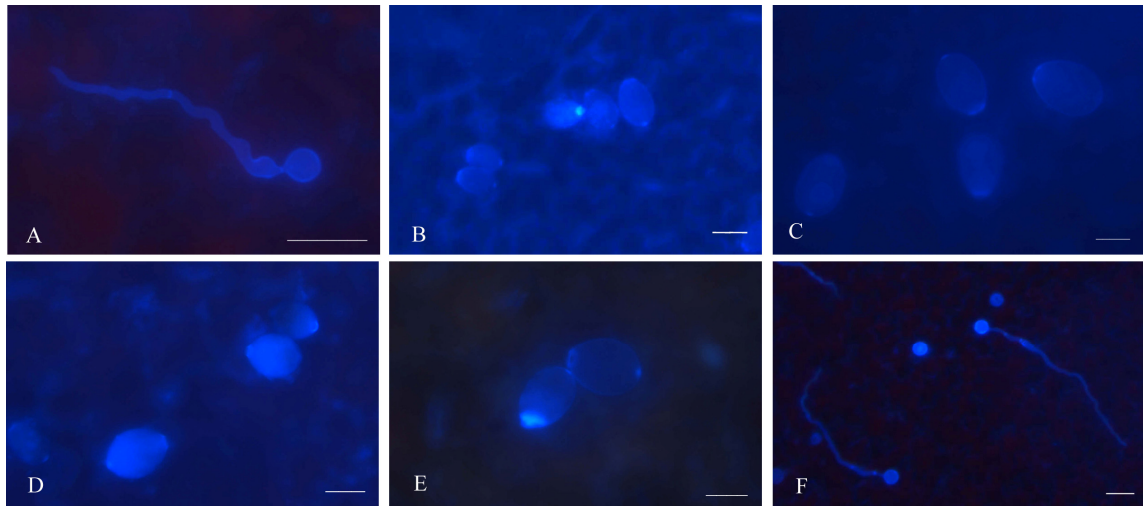


Abb. 3-32: Wirkung der Präparate auf den Schlupf von Zoosporen von *P. cubensis* unter *in vivo* Bedingungen. Die Sporangien wurden ca. 24 h nach Applikation der Präparate auf die Blattscheiben aufgebracht. Blattscheiben wurden mit: A = Wasser, B = *M. cordata*-Extrakt, C = *A. migulanus* weiß Gesamtkultur, D = *A. migulanus* Zellen, E = Gramicidin S, F = *A. migulanus* Überstand behandelt. Der Schlupf der Zoosporen wurde 24 h nach aufbringen der Sporangien auf die Blattscheiben photographisch dokumentiert, Balken = 20 µm.

### 3.1.11 Transkriptionsanalyse von Abwehrproteinen der Pflanze

Um Veränderungen in der Transkription von an der Abwehr beteiligten Proteinen zu quantifizieren, wurde zunächst Gesamt-RNA aus Gurkenpflanzen isoliert. Anschließend wurde mittels einer quantitativer Real-time PCR (qRT-PCR) die relative Transkriptmenge verschiedener Gene bestimmt. In dieser Arbeit wurde die Transkription der Glutathion-S-Transferase (GST), saure Peroxidase (POD) und des Pathogenesis-related Protein 1 (PR-1) nach Behandlung der Pflanzen mit den Präparaten untersucht. Bei GST, POD und PR-1 handelt es sich um Gene, die bei Abwehrreaktionen gegen Pathogene bzw. bei oxidativen Stress vermehrt exprimiert werden. Actin diente für die qRT-PCR als externer Standard.

#### 3.1.11.1 RNA Isolierung

Aus Gurkenpflanzen, welche 24 bzw. 48 h zuvor mit den Präparaten behandelt worden waren, wurde mit Hilfe des NucleoSpin RNA Plant Kit die Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde anschließend zur Kontrolle auf einem 1,2 % denaturierenden Formaldehydgel aufgetrennt (Abb. 3-33). Es zeigte sich ein für Pflanzen typisches Bandenmuster bestehend aus 28S, 23S, 18S und kleinerer rRNA. Es konnte davon ausgegangen werden, dass nur ein geringer Abbau durch RNAsen stattgefunden hatte.

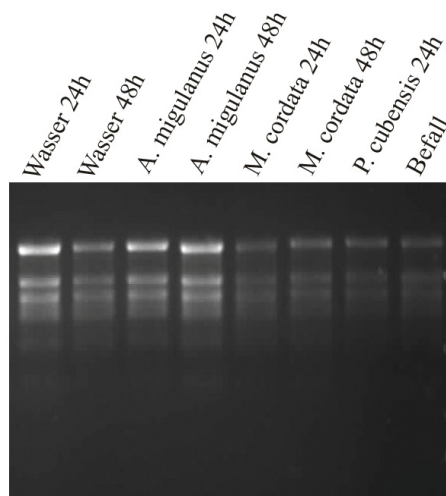


Abb. 3-33: Test der isolierten RNA auf einem 1,2 %igen denaturierenden Agarosegel. Es wurden jeweils 5 µl RNA aufgetragen.

#### 3.1.11.2 Primertest mit der cDNA von *C. sativus*

Nachdem aus der RNA mittels RT-PCR cDNA synthetisiert worden war, wurde eine PCR mit den Primerpaaren Actin Fw/ Rev, GST Fw/ Rev, POD Fw/ Rev und PR-1 Fw/ Rev mit der cDNA der wasserbehandelten Pflanzen als Template durchgeführt. Bei einer Annealing-Temperatur von 57°C und einer Elongations-Zeit von 30 sec waren die Bedingungen für alle Primerpaare gleich gut, so dass diese für die folgenden quantitativen Real-Time PCRs übernommen werden konnten. Es entstanden wie erwartet PCR-Produkte von 350 bis 150 bp Länge (Abb. 3-34).

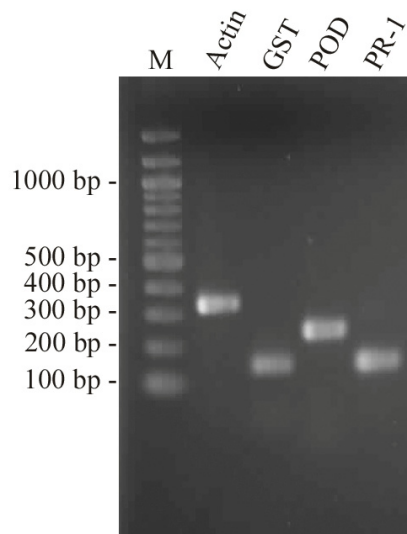


Abb. 3-34: Mit dem Primerpaaren Actin Fw/ Rev, GST Fw/ Rev, POD Fw/ Rev und PR-1 Fw/ Rev auf die cDNA von *C. sativus* durchgeführte PCR. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 % TAE-Gel aufgetrennt, M bezeichnet den 100 bp Größenstandard von NEB (# N3231).

### 3.1.11.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die relative Transkriptmenge der synthetisierten cDNA wurde über eine Standardkurve berechnet. Die Standardkurven der drei Wiederholungen der qRT-PCR wurden von 20 bis 0,02 ng/ml eingesetzter genomischer DNA aus Gurkenpflanzen mit dem Primerpaar Actin Fw/ Rev ermittelt (Abb. 3-35).

Die berechneten Geradengleichungen lauteten:

$$1) y = -0,28x + 10,30; R^2 = 0,991$$

$$2) y = -0,27x + 10,29; R^2 = 0,998$$

$$3) y = -0,28x + 9,49; R^2 = 0,991$$

Um die Spezifität der erhaltenen PCR-Produkte zu prüfen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse in einem Bereich von 50 bis 95 °C durchgeführt (Abb. 3-36). Es zeigte sich, dass die PCR Produkte der Actin-Primer bei einer Schmelztemperatur von 81 °C vollständig zu einzelsträngiger DNA denaturiert waren. Bei den PCR Produkten von GST, POD und PR-1 lagen die Schmelztemperaturen bei 78, 79,5 und 81,5 °C. Es zeigten sich keine Nebenprodukte.

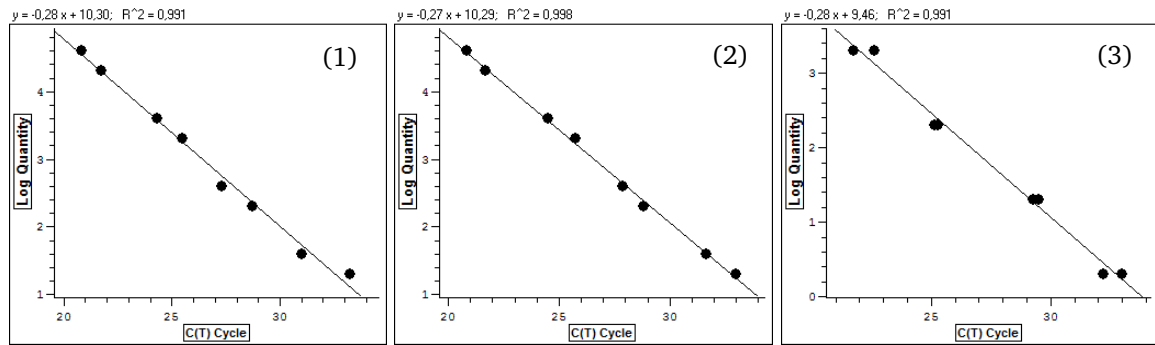


Abb. 3-35: Standardgeraden der qRT-PCR Läufe (3 Wiederholungen). Der C(T)-Wert gibt an, wie viele Zyklen nötig sind, um ein bestimmtes Fluoreszenzniveau zu erreichen und er ist umgekehrt proportional zur eingesetzten Menge an Ziel-DNA.

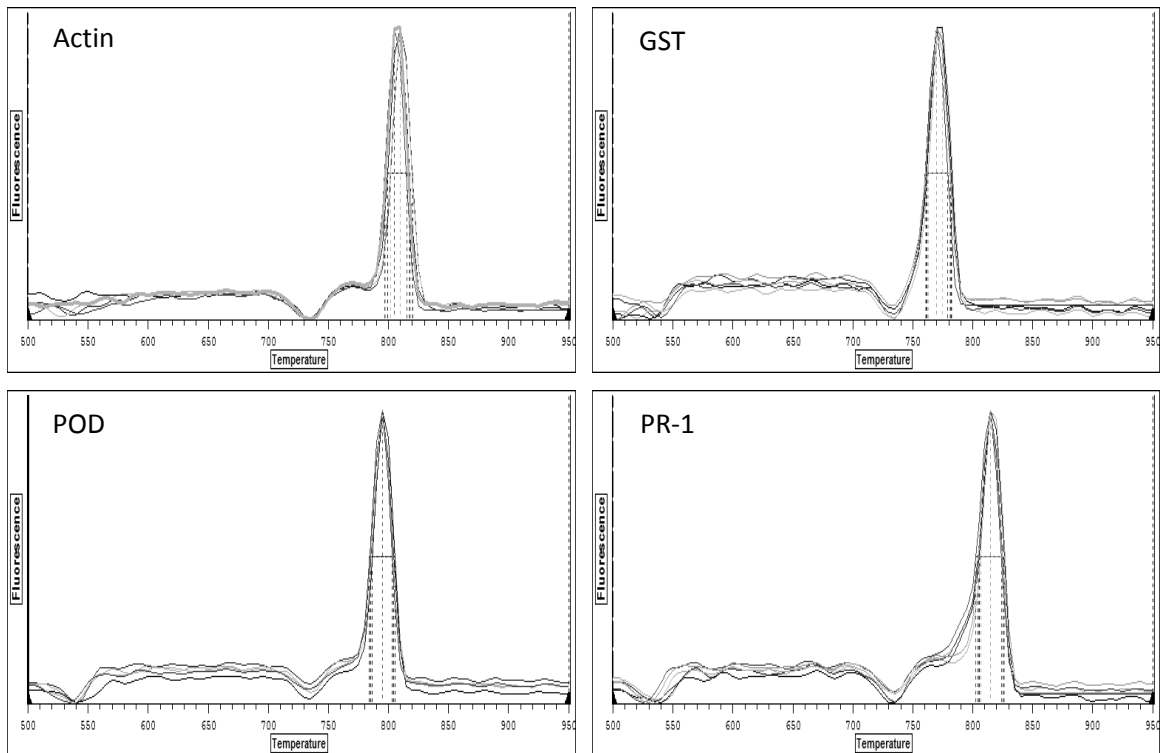


Abb. 3-36: Schmelzkurvenanalyse der amplifizierten PCR-Produkte. Die PCR-Produkte wurden bei gleichzeitiger Erfassung der Fluoreszenz durch die schrittweise Erhöhung der Temperatur aufgeschmolzen. Der einzelne Peak kennzeichnet das einzelsträngig vorliegende PCR-Produkt.

Für jede Behandlung wurden drei qRT-PCRs für jedes Primerpaar mit je zwei Wiederholungen pro PCR durchgeführt. In Abb. 3-37 wurde die Expression von GST, POD und PR-1 dargestellt. Die Behandlung der Pflanzen mit dem Extrakt aus *M. cordata* und der Bakterienkultur von *A. migulanus* weiß führte nach 24 h nicht zu einem wesentlichen Anstieg der Expression von GST. Nach 48 h stieg die relative Expressionsstärke bei beiden Behandlungen leicht auf 1,4

---

bzw. 1,8 an. Bei Pflanzen, welche schon Infektionsanzeichen von *P. cubensis* zeigten, lag die Expressionsstärke 2,5fach über dem der Kontrollpflanzen. Die Schwankungsbreite zwischen den drei Versuchen war hier jedoch sehr groß.

Im Gegensatz zu GST führte die Behandlung der Pflanzen mit den Präparaten zu einem stärkeren Anstieg der Expression von POD. Die Expressionsstärke nach 24 h war, bezogen auf die Wasserkontrolle, bei der Behandlung mit *A. migulanus* und *M. cordata* um das 79- bzw. 31,6fache angestiegen. Nach 48 h fiel die Expression bei *A. migulanus* behandelten Pflanzen jedoch stark ab (1,4) und stieg bei *M. cordata* behandelten Pflanzen auf 96,9fach weiter an. Die höchste Expression von POD zeigte sich mit durchschnittlich 1203,1fach bei Pflanzen, die seit einer Woche mit *P. cubensis* infiziert waren.

Pflanzen, welche mit der Kulturbrühe von *A. migulanus* behandelt wurden, zeigten nach 24 h einen Anstieg der Expression von PR-1 um den Faktor 4,1, welche nach 48 h wieder sank. Bei der Behandlung der Pflanzen mit *M. cordata* erhöhte sich die Expression dagegen nach 24 h nicht, stieg aber nach 48 h leicht auf 2,8fach an. Die höchste Expression von PR-1 mit einem Faktor von 9,1 zeigten die Pflanzen, welche seit einer Woche mit dem Pathogen befallen waren.



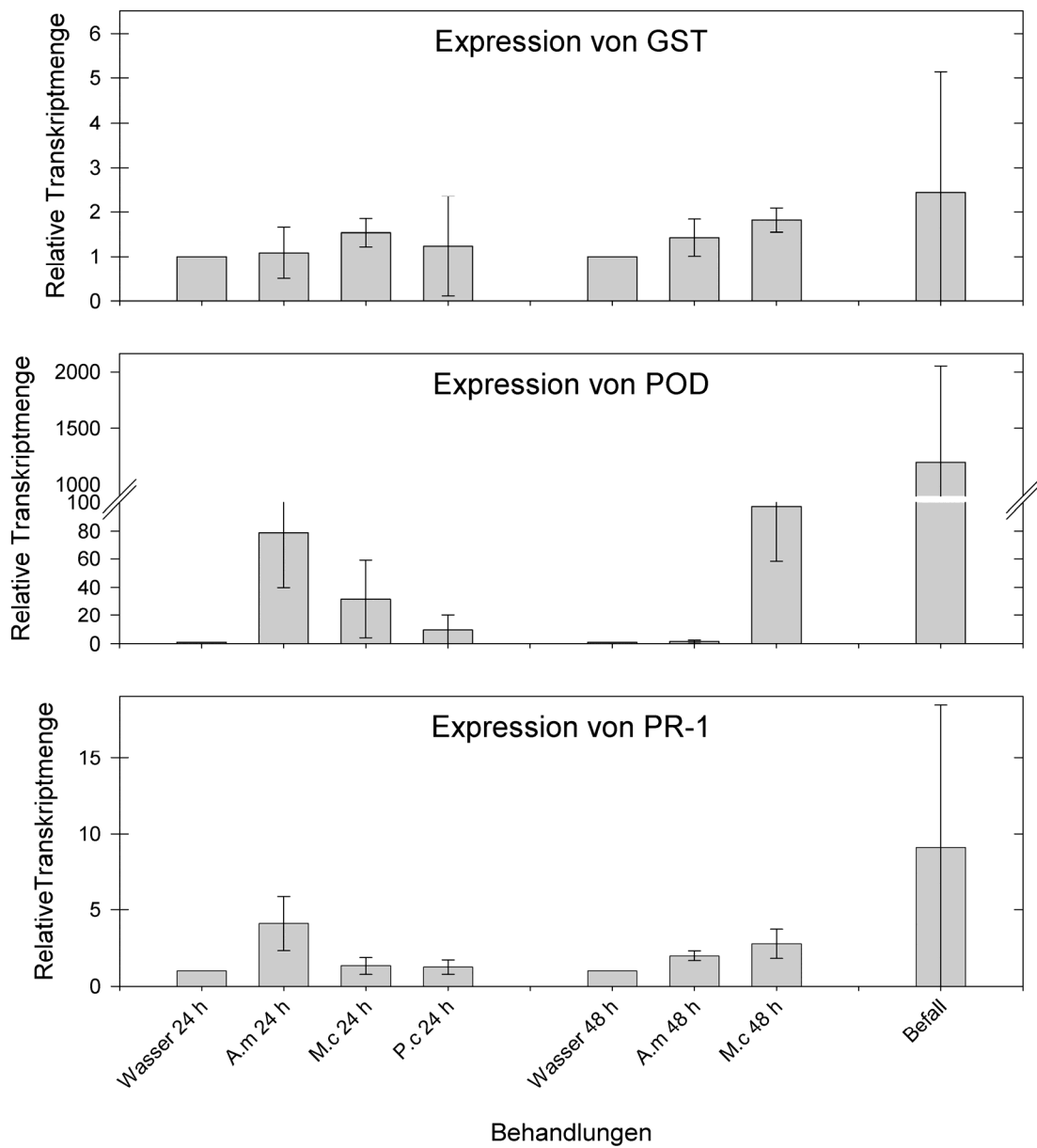


Abb. 3-37: Expression von GST-, POD- und PR-1-kodierenden Genen nach der Applikation der Kultur von *A. migulanus* weiß (A.m), *M. cordata*-Extrakt (M.c) und mit *P. cubensis* (P.c). Als Negativkontrolle dienten wasserbehandelte Pflanzen (Wasser). Die Proben wurden 24 h oder 48 h nach Applikation der Präparate genommen. Als Positivkontrolle dienten ca. 1 Woche mit *P. cubensis* befallene Pflanzen (Befall). SD= Standardabweichung.

---

## 3.2 Kultivierung von *A. migulanus*

Die Kulturbrühe aus *A. migulanus* zeigte in Biotests gegen Oomyceten an verschiedenen Kulturpflanzen eine gute Wirkung [SCHUSTER et al. 2010]. Für eine Verwendung in der Praxis werden jedoch große Mengen der Kulturbrühe benötigt, die allein in 1 L-Erlenmeyerkolben nicht herzustellen sind. Die Arbeit hatte unter anderem das Ziel verschiedene Kultivierungsmethoden zu untersuchen und zu vergleichen.

### 3.2.1 Vergleich von Flüssig- und Festfermentation von *A. migulanus* weiß

Zunächst wurden verschiedene Parameter einer Fermentation des Bakteriums *A. migulanus* weiß in Flüssigkultur (TSB) und der Fermentation auf festem Medium (TSA) miteinander verglichen mit jeweils zwei Wiederholungen pro Kultivierungsmethode. Die Durchführung ist in 2.2.3.2 beschrieben.

#### 3.2.1.1 Bestimmung der cfu

In Abb. 3-38 ist die durchschnittliche Anzahl an vegetativen Zellen sowie gebildeten Sporen der flüssig und auf festem Nährboden kultivierten *A. migulanus* Kultur dargestellt.

In der Flüssigkultur wurden nach fünf Tagen durchschnittlich  $6,34 \cdot 10^6$  cfu/ml gebildet, der Anteil an Sporen betrug  $2,85 \cdot 10^5$  cfu/ml.

Die Kultivierung auf festem Medium brachte  $1,43 \cdot 10^8$  cfu/ml mit einem Anteil an Sporen von  $1,28 \cdot 10^6$  cfu/ml. Beide Kultivierungsmethoden zeigten eine ähnliche Ausbeute an Zellen und Sporen.

### Vergleich flüssige und feste Kultivierung von *A. migulanus*

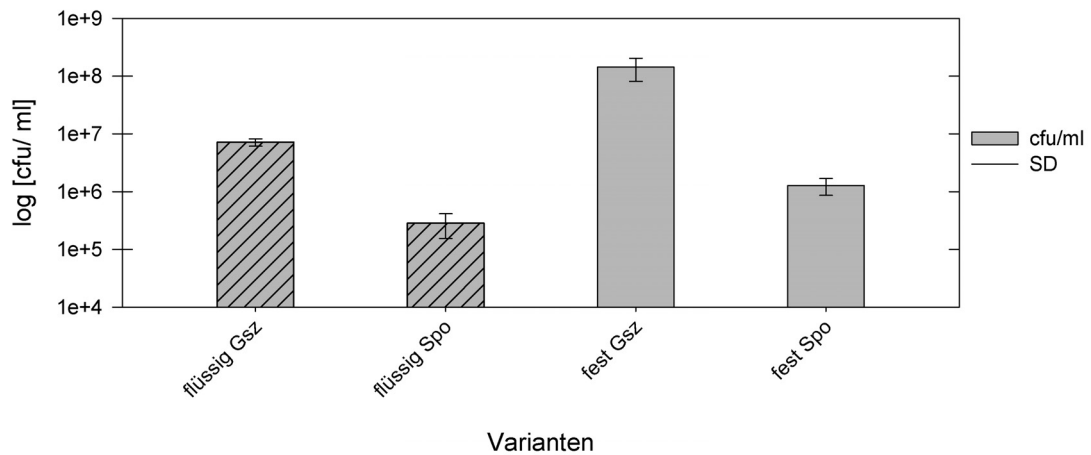


Abb. 3-38: Colony forming units (cfu/ml) aus der Kulturen in flüssigem Medium (TSB) und auf festem Medium (TSA); es wurden die Gesamtzellzahl (Gsz) sowie die Sporen (Spo) erfasst; flüssig = Kultivierung in TSB, fest = Kultivierung auf TSA, SD = Standardabweichung.

#### 3.2.1.2 Bestimmung des Gramicidingehaltes

Für die Bestimmung des Gramicidingehaltes der beiden Proben aus Kapitel 3.2.1 ergab sich aus der Standardgerade folgende Geradengleichung:

$$y = 118,3 \cdot \log(x) - 74,90; R^2 = 0,990$$

$$y = \text{Hemmhof in mm}^2$$

$$x = \text{Gehalt an GS in } \mu\text{g/ml}$$

Der Gramicidingehalt wurde von den Proben errechnet, welche im Biotest (Abb. 3-39) in 1:1 Verdünnung verwendet worden waren. Der durchschnittliche Gramicidingehalt unterschied sich bei beiden Kultivierungsmethoden nicht (Tab. 3-4). Bei der Kultivierung in flüssigem Medium wurde ein Gehalt von 539,07  $\mu\text{g/ml}$  errechnet, was einem Gehalt von etwa 1078  $\mu\text{g/ml}$  in der unverdünnten Probe entspricht. Auf festem Nährboden wurde ein Gehalt von 573,38  $\mu\text{g/ml}$  gemessen. Dies entspricht einer Menge von etwa 1146  $\mu\text{g/ml}$  in der unverdünnten Probe.

Tab. 3-4: Die Gramicidinberechnung basierte auf den Mittelwerten aus dem Hemmhoftest, bei dem verschiedene Verdünnungen zugrunde liegen; res GS = der errechnete Gramicidingehalt, Mw GS = der Mittelwert aus dem resultierenden Gramicidin S.

Probe	Hemmhof [mm]	y [mm <sup>2</sup> ]	log x	res. GS [µg/ml]	Mw GS [µg/ml]
TSB 1	10,00	100	1,66	457,7	539,07
TSB 2	10,83	117,39	1,79	620,44	
TSA 1	10,17	103,36	1,69	485,46	573,38
TSA 2	11,00	121,00	1,82	661,30	

### 3.2.1.3 Wirkung im Biotest

Die Wirkung der einzelnen Komponenten der Bakterienkultur (Zellen und Überstand) wurden separat sowie als Gesamtkultur im Biotest untersucht (Abb. 3-39). Es wurden zwei Pflanzen pro Behandlung in vier Wiederholungen eingesetzt.

Mit in Flüssigkultur angezogenem *A. migulanus* wurden Wirkungsgrade von 86,5 – 96,2 % gegen *P. cubensis* erzielt, wobei die Gesamtkultur die beste Wirkung hatte.

Nach der Kultivierung auf festem Medium (TSA) wurden die gewonnenen Zellen in VE-Wasser aufgenommen und mindestens einen Tag im Kühlschrank gelagert. Hier konnte nach der Behandlung der Pflanzen mit der Zellensuspension oder Gesamtkultur eine Befallsreduktion von 91,4 bzw. 85,5 % beobachtet werden. Diese Befallswerte waren nicht signifikant verschieden zur Behandlung der Pflanzen mit der Flüssigkultur von *A. migulanus*. Wurden die Pflanzen mit dem VE-Wasser-Überstand der Kultur von festem Medium behandelt, so zeigte sich dagegen keine signifikante Befallsreduktion verglichen mit der Wasserkontrolle.

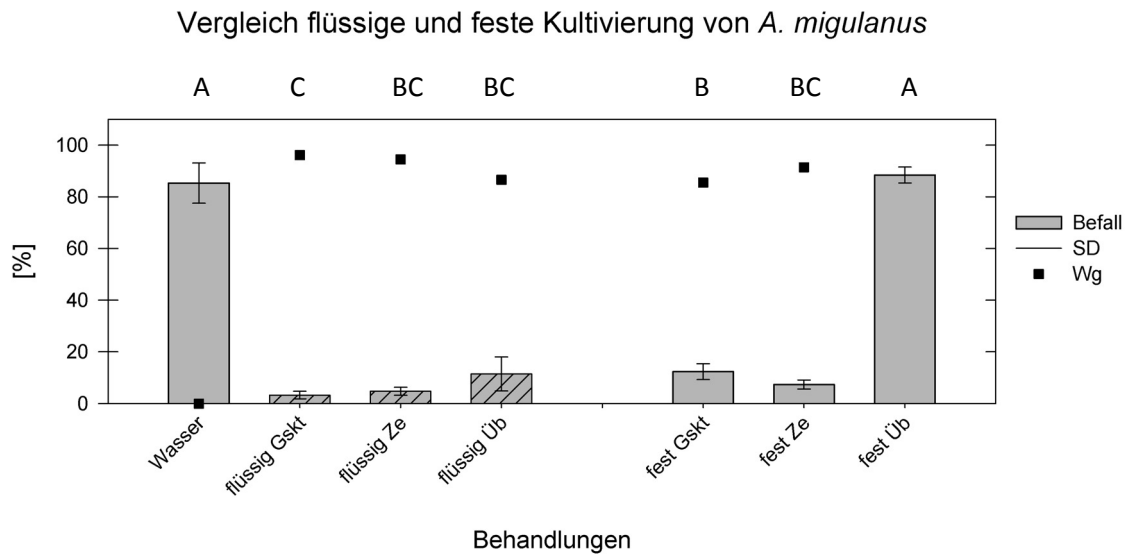


Abb. 3-39: Wirkung von fünf Tage alten Kulturen von *A. migulanus*, die entweder in flüssigem oder auf festem Medium fermentiert wurden, auf den Befall mit *P. cubensis* an Gurke; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ); flüssig = Kultur in TSB, fest = Kultur auf TSA, Üb = Überstand, Ze = Zellen, Gskt = Gesamtkultur, SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

### 3.2.2 Vergleich der Kultivierung von *A. migulanus* für die Praxisversuche

In den Tab. 3-8 und 3-9 sind die Daten zu Zell- und Sporenbildung, optischer Dichte und Wirkung im Biotest gegen *P. cubensis* an der Gurke für die Kultivierung auf festem und in flüssigem Medium dargestellt. Die Daten wurden aus der Herstellung von Spritzbrühen für die Anwendung in der Praxis gewonnen [siehe SCHERF et al 2010]. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Proben ausgewählt, die zur selben Zeit kultiviert wurden.

Bei der Kultivierung in 200 ml TSB (Trypton-Soja Brühe, Tab. 3-5) wurden durchschnittlich  $4,93 \cdot 10^6$  cfu/ml gebildet. Mit  $2,30 \cdot 10^6$  cfu/ml waren etwa die Hälfte der Zellen zu Sporen umgebildet.

Nach der Kultivierung auf festem Medium (Trypton-Soja Agar, Tab. 3-6) wurden die Bakterien jeweils in 100 ml Wasser pro Platte aufgenommen (s. Kapitel 2.2.3.2). In diesem Ansatz wurden durchschnittlich  $8,17 \cdot 10^7$  cfu/ml gemessen. Der Anteil an Sporen betrug durchschnittlich  $1,48 \cdot 10^8$  cfu/ml. Hier kann man eine 100 %ige Sporenbildung annehmen.

Es zeigte sich, dass die optische Dichte der Kultur auf TSA mit 0,487 etwa viermal höher war, als in der Kultur in TSB (0,098). Daher wurde für die Anwendung im Praxisversuch die Kultur aus der Kultivierung auf TSA zunächst 4fach verdünnt. Die Ergebnisse der Gramicidin-Bestimmungen und der Biotests beziehen sich darauf.

In der flüssigen Kultur wurde ein durchschnittlicher Gramacidin S-Gehalt von 898,74 µg/ml bestimmt. Der Gehalt der 4fach verdünnten, auf TSA gewachsenen Kultur betrug durchschnittlich 801,66 µg/ml. Bei beiden Kultivierungsmethoden wurden in Biotests mit einer 1:1 Verdünnung Wirkungsgrade von 95,12 und 91,40 % erzielt. Der durchschnittliche Befall in der Kontrolle war mit 91,38 % als hoch einzuschätzen.

Tab. 3-5: Zusammenfassung der verschiedenen Parameter, welche aus verschiedenen Flüssigkulturen im 1 L-Erlenmeyerkolben (TSB) von *A. migulanus* weiß nach fünf Tagen erhoben wurden. ges. = gesamt, OD = optische Dichte, GS unverd. = Gramacidins S- Gehalt bestimmt aus einer unverdünnten Probe, Wg 1:1 = Wirkungsgrad im Biotest mit 1:1 verdünnter Kultur, Mw= Mittelwert.

Produktions- datum	Zellen ges. [cfu/ml]	Sporen [cfu/ml]	OD <sub>600</sub> 1:10	GS unver. [µg/ml]	Befall in Kontrolle [%]	Wg 1:1 Verdünn. [%]
10.06.09	4,40 *10 <sup>6</sup>	3,40*10 <sup>6</sup>	n.b.	905,71	97,50	93,14
18.06.09	2,13*10 <sup>6</sup>	1,23*10 <sup>6</sup>	0,134	1127,42	85,63	95,85
08.07.09	4,60*10 <sup>6</sup>	3,6*10 <sup>6</sup>	0,096	1046,93	87,50	98,21
15.07.09	4,47*10 <sup>6</sup>	1,73*10 <sup>7</sup>	0,092	1046,93	99,25	96,73
30.07.09	1,34*10 <sup>7</sup>	fehlt	0,093	786,94	84,88	87,11
05.08.09	2,57*10 <sup>6</sup>	1,97*10 <sup>6</sup>	0,092	734,71	84,88	98,90
13.08.09	2,90*10 <sup>6</sup>	1,87*10 <sup>6</sup>	0,081	642,52	100,00	95,94
Mw	4,93*10 <sup>6</sup>	2,30*10 <sup>6</sup>	0,098	898,74	91,38	95,12

Tab. 3-6: Zusammenfassung der verschiedenen Parameter, welche aus verschiedenen Fermentationen auf festem Medium (TSA) von *A. migulanus* weiß nach fünf Tagen erhoben wurden. Bakterien wurden in 100 ml VE-Wasser pro Platte aufgenommen und davon die OD ermittelt, OD = optische Dichte. Die Kultur wurde anschließend 4ach verdünnt und daraus wurde der Gramicidingehalt ermittelt, GS 1:4 = Gramicidins S- Gehalt bestimmt aus 1:4 verdünnter Probe. Für den Biotest wurde diese Probe 1:1 verdünnt, Wg 1:1 = Wirkungsgrad im Biotest mit 1:1 verdünnter Kultur. Mw= Mittelwert, ges. = gesamt.

Produktions- datum	Zellen ges. [cfu/ml]	Sporen [cfu/ml]	OD <sub>600</sub> 1:10	GS 1:4 [µg/ml]	Befall in Kontrolle [%]	Wg 1:1 Verdünn. [%]
10.06.09	n.b.	n.b.	n.b.	686,7	97,50	80,45
18.06.09	2,06*10 <sup>7</sup>	6,04*10 <sup>7</sup>	0,608	786,94	85,63	98,47
08.07.09	4,39*10 <sup>7</sup>	1,67*10 <sup>8</sup>	0,468	843,78	87,50	92,93
15.07.09	6,80*10 <sup>7</sup>	1,90*10 <sup>8</sup>	0,545	786,94	99,25	77,64
30.07.09	1,18*10 <sup>8</sup>	1,61*10 <sup>7</sup>	0,455	905,71	84,88	98,90
05.08.09	8,57*10 <sup>7</sup>	2,32*10 <sup>8</sup>	0,479	814,62	84,88	93,00
13.08.09	1,54*10 <sup>8</sup>	2,21*10 <sup>8</sup>	0,366	786,94	100,00	98,44
Mw	8,17*10 <sup>7</sup>	1,48*10 <sup>8</sup>	0,487	801,66	91,38	91,40

In Tab. 3-7 sind die Daten aus den Kultivierungen, welche bei der Firma bio-ferm GmbH durchgeführt wurden, dargestellt. Hier wurden Kultivierungen im 10 L und im 7 L Fermenter durchgeführt. Zusätzlich wurde *A. migulanus* weiß in 1 L und 2 L Erlenmeyerkolben sowie im 1 L Schikanekolben kultiviert. Die Anzucht dauerte jeweils fünf Tage.

In allen Kultivierungen in Fermentern lag die Menge an Zellen insgesamt zwischen 2,27\*10<sup>6</sup> und 1,42\*10<sup>8</sup> cfu/ml. Davon waren 2,27\*10<sup>6</sup> - 2,13\*10<sup>8</sup> cfu/ml Sporen. Es wurde jedoch sehr wenig oder kein Gramicidin S produziert. Im Biotest wurden mit der 1:1 verdünnten Kulturbrühe Wirkungsgrade von maximal 37,66 % erzielt.

Bei der Kultivierung in den Kolben waren keine großen Unterschiede zu sehen. Mit 9,0\*10<sup>5</sup> cfu/ml war die Menge an Zellen im 1 L Schikanekolben am geringsten. Die Menge an Sporen betrug hier 6,67\*10<sup>4</sup> cfu/ml. Im 1L Erlenmeyerkolben wurde die höchste Zellzahl mit 2,65\*10<sup>7</sup> cfu/ml erzielt. Es wurden 2,17\*10<sup>7</sup> cfu/ml Sporen gebildet. Die Gramicidingehalte aller Proben, welche im Kolben fermentiert wurden, lagen zwischen 300,92 und 529,74 µg/ml. Mit diesen Kulturen wurden in den Biotests (1:1 verdünnt) hohe Wirkungsgrade von über 90 % erreicht.

Tab.3-7: Zusammenfassung der verschiedenen Parameter, welche aus verschiedenen Flüssigkulturen von *A. migulanus* weiß der Firma Bioprotect in verschiedenen Fermentergrößen nach fünf Tagen erhoben wurden. ges. = gesamt, OD = optische Dichte, GS unverd. = Gramacidins S- Gehalt bestimmt aus einer unverdünnten Probe, Wg 1:1 = Wirkungsgrad im Biotest mit 1:1 verdünnter Kultur.

Art	Zellen ges. [cfu/ml]	Sporen [cfu/ml]	OD <sub>600</sub> 1:10	GS unverd. [µg/ml]	Befall in Kontrolle [%]	Wg 1:1 Verdünn. [%]
10 L Fermenter	6,77*10 <sup>7</sup>	1,67*10 <sup>7</sup>	0,012	0	72,50	0
10 L Fermenter	zu kleine Verd	zu kleine Verd	0,023	78,69	99,25	37,66
7 L Fermenter	8,13*10 <sup>6</sup>	3,23*10 <sup>7</sup>	0,043	0	97,50	36,54
7 L Fermenter	2,27*10 <sup>6</sup>	2,13*10 <sup>8</sup>	0,116	90,57	73,75	0
7 L Fermenter	1,42*10 <sup>8</sup>	2,27*10 <sup>6</sup>	0,101	0	93,75	5,33
1L Erlenmk.	3,13*10 <sup>6</sup>	1,07*10 <sup>6</sup>	0,059	393,47	100	95,81
1L Erlenmk.	2,65*10 <sup>7</sup>	2,17*10 <sup>7</sup>	0,067	529,74	99,25	96,6
2L Erlenmk.	5,87*10 <sup>6</sup>	6,13*10 <sup>6</sup>	0,052	321,26	100	94,56
2L Erlenmk.	n.b.	n.b.	0,064	529,74	87,50	97,00
1L Schikanek.	7,16*10 <sup>6</sup>	6,67*10 <sup>4</sup>	0,048	343,35	99,25	76,7
1L Schikanek.	9,00*10 <sup>5</sup>	6,67*10 <sup>4</sup>	0,045	300,92	84,88	92,12



---

### 3.3 Phylogenetische und taxonomische Einordnung von *A. migulanus* Phänotypen

Durch die Kultivierung von aufeinanderfolgenden Flüssigkulturen von *A. migulanus* WT kam es zur Ausbildung verschiedener Kolonieformen auf 1/10 TSA-Platten. Dieses Phänomen ist nicht unbekannt und wurde auch schon von ZHARIKOVA et al. [1964] und BERDITSCH et al. [2007] untersucht und beschrieben. In Versuchen im JKI in Darmstadt wurden Kolonien von *A. migulanus* gefunden, welche zum Teil unterschiedliche Eigenschaften hatten. Aus der Sammlung wurden sechs Stämme ausgewählt und näher untersucht.

#### 3.3.1 Phänologische Beschreibung

Abb. 3-40 A zeigt den Phänotyp einer Kolonie von *A. migulanus* Wildtyp (WT). Dieser Stamm kam aus Schottland und ist dort hinterlegt als NCIMB 7096. Die Kolonie war weiß, im Zentrum der Kolonie dichter weiß und sie besaß einen gelappten Rand. Ihre Struktur war körnig und die Oberfläche war rau und konvex.

Bei *A. migulanus* E1 (Abb. 3-40 C) handelt es sich um einen Stamm, der kein Gramacidin S bildet. Er wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Seddon der Universität von Aberdeen zur Verfügung gestellt. Die Kolonie von *A. migulanus* E1 war ebenfalls weiß. Ihr Rand war gelappt bis gewellt. Die Struktur war stark körnig und die Oberfläche konvex. Es zeichneten sich drei ringförmige Zonen ab.

Nach aufeinanderfolgender Kultivierung von *A. migulanus* WT in TSB gab es leichte Veränderungen der Phänotypen der Bakterienkolonien. Daraufhin wurden drei Stämme isoliert und näher untersucht. Es handelte sich dabei um die Stämme weiß (Abb. 3-40 B), transluzent (Abb. 3-40 E) und um Nr. 10 (Abb. 3-40 F).

*A. migulanus* weiß bildete Kolonien, welche dichter weiß erschienen als der WT. Ihr Rand war gelappt bis gewellt. Die Struktur erschien körnig und die Oberfläche war konvex und rau.

*A. migulanus* transluzent (Abb. 3-40 E) zeichnete sich durch durchscheinende Kolonien aus. Der Rand war stark gelappt und die Kolonie strukturlos. Ihre Oberflächen waren konvex und rau.

Die Kolonien von Nr. 10 (Abb. 3-40 F) waren weiß mit durchscheinendem, fast glattem Rand. Sie waren in fünf kreisförmige Zonen gegliedert und ihre Oberfläche war konvex und glatt, ihre Struktur nicht körnig.

Aus der Kultivierung von *A. migulanus* WT durch die Firma bio-ferm GmbH (früher Bioprotect GmbH) stammt *A. migulanus* Bioprotect. Der Phänotyp der Kolonie (Abb. 3-40 D) ähnelte sehr stark der Kolonie von *A. migulanus* weiß. Ihre Farbe war weiß, im Zentrum etwas dichter

---

weiß. Der Rand war gelappt bis gewellt und die Struktur leicht körnig. Die Oberfläche war konvex und rau.

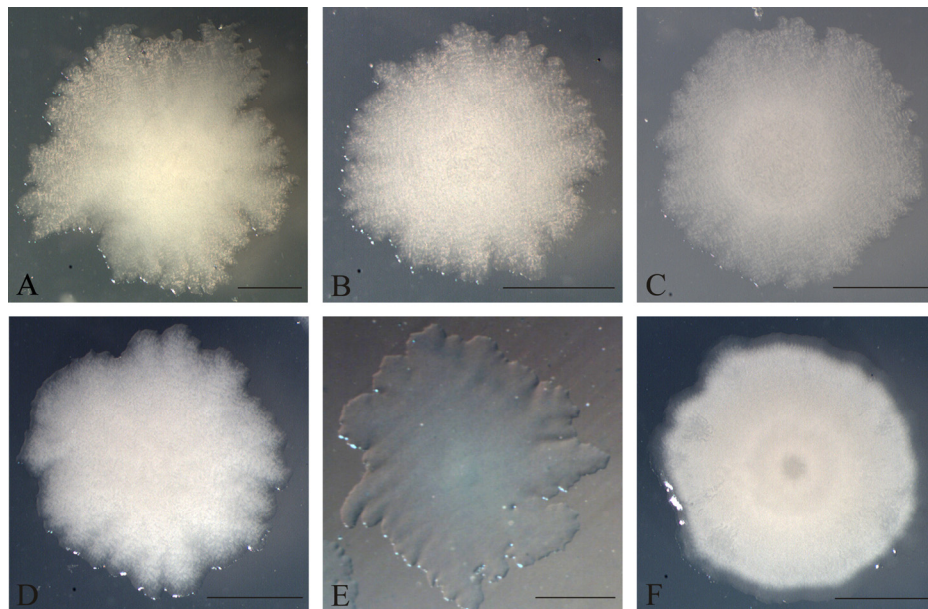


Abb. 3-40: Kolonieformen der verschiedenen Stämme von *A. migulanus* nach dreitägigem Wachstum auf 1/10 TSA bei 37 °C. A = *A. migulanus* WT, B = *A. migulanus* weiß, C = *A. migulanus* E1, D = *A. migulanus* Bioprotect, E = *A. migulanus* transluzent, F = Nr. 10. Balkenlänge = 1 mm. Fotos von Wölfe [2010].

### 3.3.2 Dünnschichtchromatographie

Mit den verschiedenen Isolaten aus *A. migulanus* wurde eine Dünnschichtchromatographie auf Cellulose durchgeführt (Abb. 3-41).

Es zeigte sich, dass fast alle Phänotypen ein ähnliches Bandenmuster aufwiesen. Die stärkste Bande war die von Gramacidin S (Rf-Wert von 0,9). Diese Bande fehlte wie erwartet bei *A. migulanus* E1. Das Isolat Nr. 10 hatte ein zu den *A. migulanus*-Stämmen völlig verschiedenes Bandenmuster. Die Bande, welche Gramacidin S repräsentiert, fehlte. Es kann angenommen werden, dass es sich hierbei nicht um den Gramacidin S-Bildner *A. migulanus* handelt.

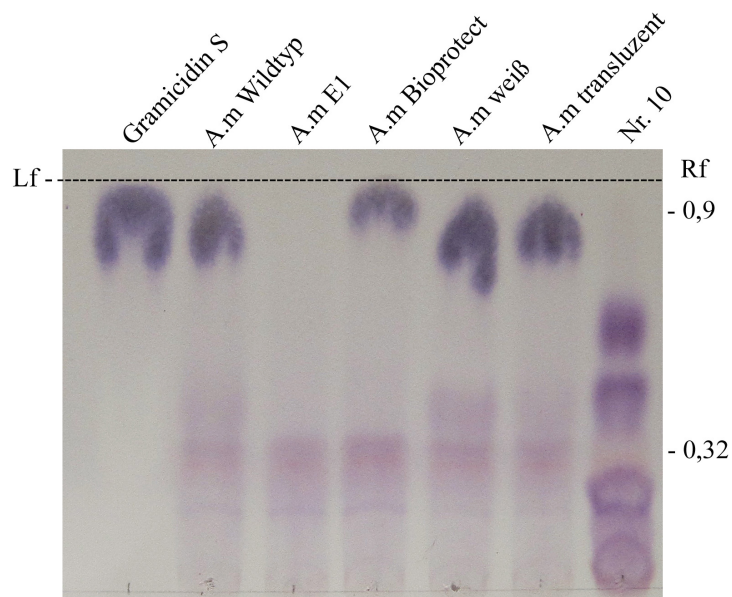


Abb. 3-41: Dünnschichtchromatographie der Isolate *A. migulanus* Wildtyp, E1, Bioprotect, weiß, transluzent und Nr. 10 nach einem ethanolischen Aufschluss der Zellen. Laufmittel war Butan-1-ol, Eisessig, Wasser (4:1:1), Banden wurden mit Ninhydrin-Butanol (0,5 %) gefärbt. A.m = *Aneurinibacillus migulanus*, Rf = Retentionsfaktor, Lf = Laufmittelfront.

### 3.3.3 Gramicidin S-Bestimmung

Die Standardgerade für Gramicidin S wurde aus dem Mittelwert aus sieben GS-Bestimmungen erstellt. Daraus ließ sich folgende Geradengleichung zur Berechnung der Gramicidingehalte ermitteln.

$$y = 193,5 \cdot \log(x) - 249,2; R^2 = 0,98$$

$$y = \text{Hemmhof mm}^2$$

$$x = \text{Gramicidingehalt in } \mu\text{g/ml}$$

In Abb. 3-42 sind die durchschnittlichen Gramicidin S Gehalte der fünf verschiedenen Phänotypen von *A. migulanus* und Nr. 10 dargestellt. Vom Wildtyp wurde mit durchschnittlich 1295,35  $\mu\text{g/ml}$  das meiste Gramicidin produziert. Der weiße Stamm und der Stamm Bioprotect produzierten 1231,82 und 1150,17  $\mu\text{g/ml}$  Gramicidin S. Etwa halb so viel Gramicidin S (513,56  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde durch den Stamm *A. migulanus* transluzent gebildet. Die beiden Stämme *A. migulanus* E1 und Nr. 10 bildeten wie erwartet kein Gramicidin S.

### *A. migulanus* Stämme - Gramicidingehalt

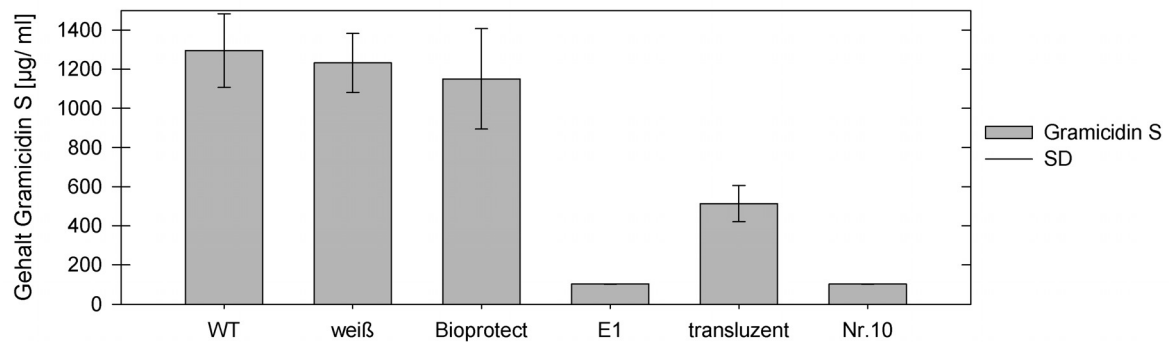


Abb. 3-42: Vergleich der Produktion von Gramicidin S der verschiedenen Typen von *A. migulanus* nach 5tägiger Fermentation. *A. migulanus* Wildtyp (WT), weiß, Bioprotect, E1, transluzent und Typ Nr. 10. SD = Standardabweichung.

#### 3.3.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl

In Abb. 3-43 ist der Wachstumsverlauf der verschiedenen *A. migulanus* Stämme über fünf Tage dargestellt. Es zeigte sich, dass nach dem ersten Tag bei den meisten Stämmen die maximale Zellzahl (ca.  $6 \cdot 10^7$ ) schon erreicht worden war. Der Stamm *A. migulanus* E1 hatte nach einem Tag eine Gesamtzellzahl von  $9 \cdot 10^7$  cfu/ml, welche am dritten Tag bei  $1,5 \cdot 10^8$  cfu/ml lag und danach wieder leicht abfiel. Von den Gramicidin S bildenden Stämmen ließ sich bei *A. migulanus* Bioprotect nach dem vierten Tag die größte Gesamtzellzahl ( $1,2 \cdot 10^8$ ) errechnen. Bei allen Stämmen blieb die Zellzahl über die fünf Tage dauernde Kultivierung relativ konstant, nur bei dem Stamm *A. migulanus* transluzent sank die Gesamtzellzahl von  $4,3 \cdot 10^7$  am ersten Tag auf  $2,5 \cdot 10^6$  am fünften Tag. Insgesamt wurde bei allen Stämmen über die drei Versuche eine relativ große Schwankung festgestellt. Nach einem Tag Wachstum zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Zellen der einzelnen *A. migulanus* Varianten. Im Laufe der Kultivierung hatte nur der Stamm *A. migulanus* E1 eine signifikant höhere Gesamtzellzahl, welche am fünften Tag der Kultivierung wieder abnahm (Tab. 3-8).

Der Stamm Nr. 10 wurde nicht dargestellt, weil es problematisch war die Zellzahl zu bestimmen, da die Kultur zum Verklumpen neigte.

### Gesamtanzahl Zellen der verschiedenen *A. migulanus* Stämme

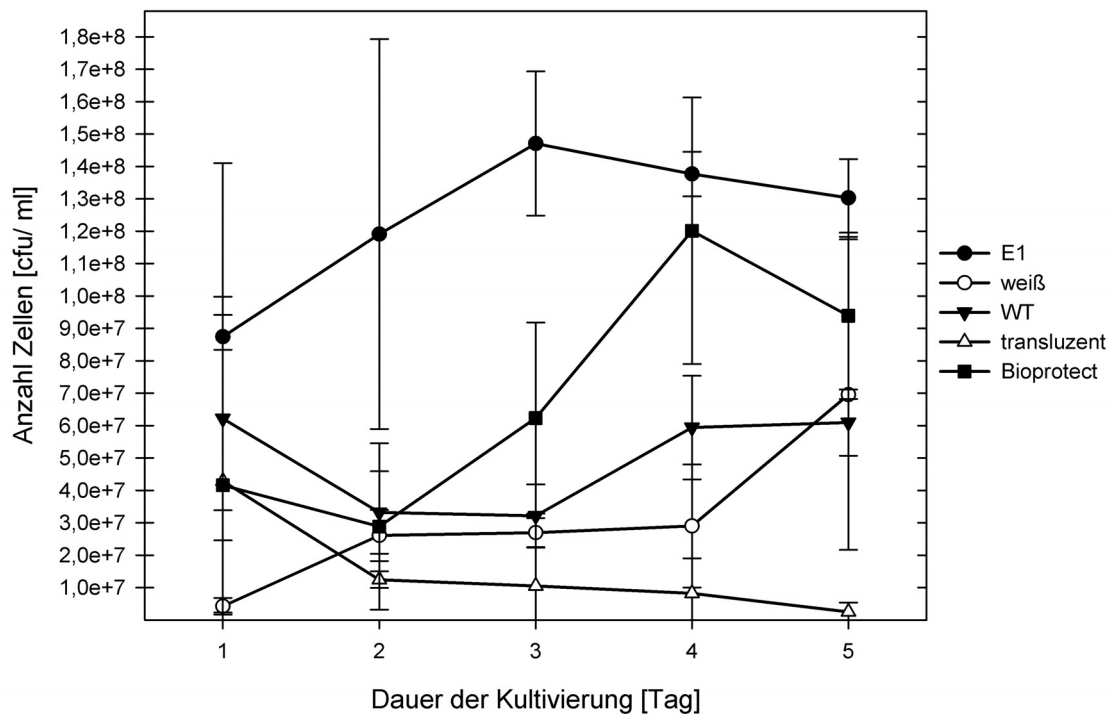


Abb. 3-43: Vergleich der Anzahl an gebildeten Zellen (vegetative Zellen und Sporen) über eine Fermentationsdauer von 5 Tagen bei 37 °C. Es wurden die *A. migulanus* Typen E1, weiß, Wildtyp (WT), transluzent und Bioprotect untersucht.

Tab. 3-8: Zu Abb. 3-43 zugehöriger Signifikanztest, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ )

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>A. migulanus</i> WT	A	A	AB	AB	AB
<i>A. migulanus</i> weiß	A	A	AB	A	AB
<i>A. migulanus</i> E1	A	B	C	C	B
<i>A. migulanus</i> Bioprotect	A	A	B	BC	B
<i>A. migulanus</i> transluzent	A	A	A	A	A

### 3.3.5 Bestimmung der Anzahl Sporen

Der Anteil der gebildeten Sporen der Kultivierungen sind in Abb. 3-44 aufgetragen.

Es zeigte sich, dass in allen Stämmen insgesamt weniger cfu/ml gebildet wurden als bei der Gesamtzellzahl. Nach einem Tag betrug der Anteil an Sporen in allen Stämmen ca. 2,5 –

11,9 % im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Nach zwei Tagen stieg in den Stämmen E1, weiß, WT und Bioprotect die Anzahl der gebildeten Sporen auf  $4,5 \cdot 10^6$  –  $6,1 \cdot 10^7$  cfu/ml an und blieb bei allen auf dem relativ gleichen Niveau. Ab dem zweiten Tag der Kultivierung waren bei der Variante *A. migulanus* E1 signifikant Sporen gebildet worden verglichen mit den anderen Varianten (Tab. 3-9). Die Ausnahme bildete hier der Stamm *A. migulanus* transluzent, welcher über den gesamten Zeitraum von fünf Tagen keine Sporen bildete. Der Anteil an Sporen variierte aufgrund der Schwankungen bei der Zellzahlbestimmung sehr. Wurde ein Durchschnitt aus den Tagen der Kultivierung 2 – 4 genommen, so produzierte der Stamm Bioprotect mit 18,09 % den geringsten Anteil an Sporen und *A. migulanus* E1 mit 41,64 % den größten (Tab. 3-10)

Anzahl Sporen der verschiedenen *A. migulanus* Stämme

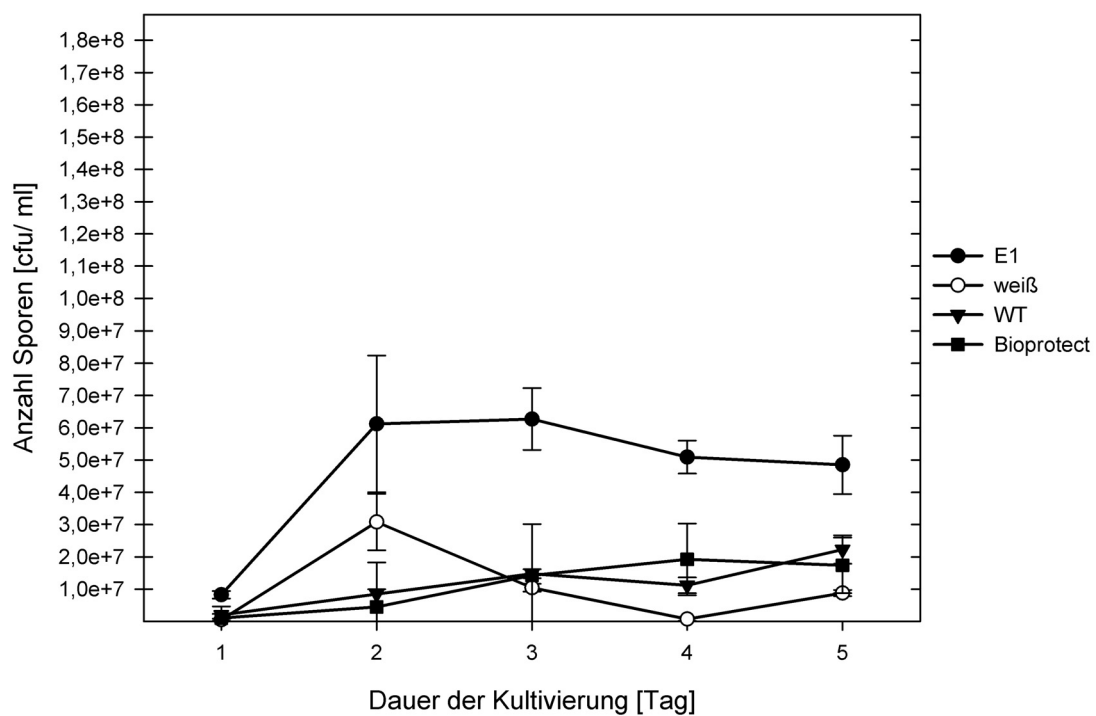


Abb. 3-44: Vergleich der Anzahl an gebildeten Sporen über eine Fermentationsdauer von 5 Tagen bei 37 °C. Es wurden die *A. migulanus* Typen E1, weiß, Wildtyp (WT), transluzent und Bioprotect untersucht.

Tab. 3-9: Zu Abb. 3-44 zugehöriger Signifikanztest, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ )

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>A. migulanus</i> WT	A	A	A	A	A
<i>A. migulanus</i> weiß	A	AB	A	A	A
<i>A. migulanus</i> E1	B	B	B	B	B
<i>A. migulanus</i> Bioprotect	A	A	A	A	A

Tab. 3-10: Durchschnittlicher Anteil an Sporen nach 2 – 5 Tagen Kultivierung in TSB aus Versuch in Abb. 3-48.

	Gesamtanzahl Zellen [cfu/ml]	Anzahl Sporen [cfu/ml]	Anteil Sporen an Gesamtzellzahl [%]
<i>A. migulanus</i> WT	$4,64 \cdot 10^7$	$1,42 \cdot 10^7$	30,60
<i>A. migulanus</i> weiß	$3,79 \cdot 10^7$	$1,27 \cdot 10^7$	33,51
<i>A. migulanus</i> E1	$1,34 \cdot 10^8$	$5,58 \cdot 10^7$	41,64
<i>A. migulanus</i> Bioprotect	$7,63 \cdot 10^7$	$1,38 \cdot 10^7$	18,09
<i>A. migulanus</i> transluzent	$8,39 \cdot 10^6$	keine	0

### 3.3.6 Wirkung im Biotest an Gurken

Die Biotests wurden an Gurken im Zweiblattstadium mit acht Pflanzen pro Variante durchgeführt. Alle Phänotypen wurden als fünf Tage alte Flüssigkultur in einer 1:1 Verdünnung auf die Pflanzen appliziert.

Im Biotest erzielten die Stämme *A. migulanus* WT und weiß mit 87,89 und 75,12 % die höchsten Wirkungsgrade der untersuchten Varianten (Abb. 3-45). Der Stamm *A. migulanus* Bioprotect wie auch transluzent waren weniger wirksam und erreichten Wirkungsgrade von 48,73 und 36,55 %. Durch die Gramicidinnegativmutante E1 wurde der Befall mit *P. cubensis* nicht vermindert. Auch der Typ Nr. 10 war unwirksam, so dass die Befallsstärke der der Wasserkontrolle glich (74,38 %).

### *A. migulanus* Stämme - Biotest

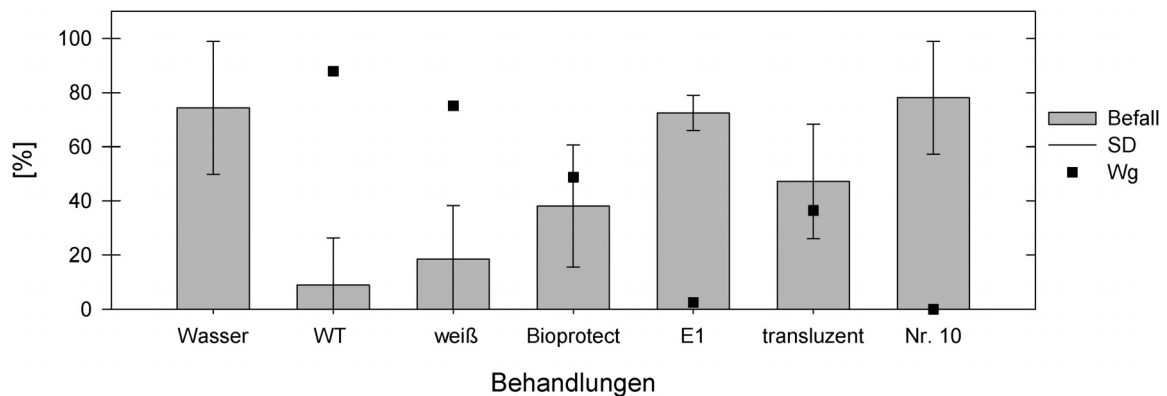


Abb. 3-45: Vergleich der Wirkung der verschiedenen Typen von *A. migulanus* im Biotest nach 5tägiger Fermentation. Untersucht wurden die Wirkung der Typen *A. migulanus* Wildtyp (WT), weiß, Bioprotect, E1, transluzent und Typ Nr. 10 gegen den Falschen Mehltau an Gurken in 1:1 Verdünnung. SD = Standardabweichung und Wg = Wirkungsgrad.

#### 3.3.7 Einordnung der verschiedenen Stämme mittels Fettsäureanalyse

Anhand der Fettsäureanalyse wird Rückschluss auf die Zusammensetzung der Fettsäuremethylester von Mikroorganismen gezogen. Die Untersuchung der Fettsäuren wurde von Herrn Dr. Felgentreu des JKI für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz in Berlin durchgeführt. Hiernach wurden die verschiedenen Phänotypen als *Aneurinibacillus migulanus* mit einer Ähnlichkeit von 61,0 – 84,0 % zum in der Datenbank vorhandenen Standardstamm bestimmt. Die Variante Nr. 10 wurde mit 80,9 % Ähnlichkeit zu den Stämmen in der MIDI-Datenbank als *Brevibacillus centrosporus* und mit 55,1 % Ähnlichkeit als *Brevibacillus choshinensis* identifiziert (Tab. 3-11).



Tab. 3-11: Ergebnisse aus der Fettsäureanalyse, SI= Similarity Identity zum Referenzstamm in der MIDI-Datenbank [%].

Isolatbezeichnung JKI	Taxonomische Einordnung	SI [%]
<i>A. migulanus</i> weiß	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	75,8
<i>A. migulanus</i> E1	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	61,0
<i>A. migulanus</i> Bioprotect	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	84,0
<i>A. migulanus</i> transluzent	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	75,7
Nr. 10 weiß	<i>Brevibacillus centrosporus</i> <i>Brevibacillus choshinensis</i>	80,9 55,1

### 3.3.8 Phylogenetische Einordnung der verschiedenen Stämme

#### 3.3.8.1 Gelchromatographie

Für die Amplifikation der 16S rRNA-kodierende Sequenzen der Phänotypen von *A. migulanus* und von Nr. 10 wurden die Primer fD1 und rP2 mit einer Annealing-Temperatur von 45 °C und einer Elongations-Zeit von 2 min über 34 Zyklen verwendet. Es wurde ein Produkt von 1,5 kb Größe erwartet, welches auch erhalten wurde (Abb. 3-46). Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und extern sequenziert.

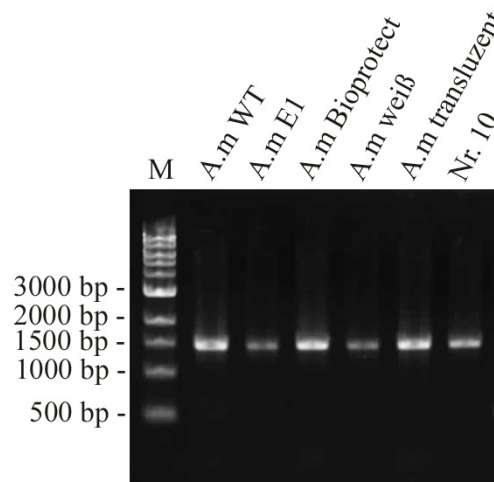


Abb. 3-46: mit dem Primerpaar fD1/ rP2 an den Stämmen von *A. migulanus* und an Nr. 10 durchgeführte PCR. A.m = *A. migulanus*, WT = Wildtyp, M bezeichnet den 1 kb Größenstandard von NEB (# N3232).

---

### 3.3.8.2 Phylogenie

Zur phylogenetischen Einordnung wurden die eigenen Sequenzen von *A. migulanus* und von Nr. 10 mit den von GOTO et al. [2004] erhaltenen Sequenzen verglichen. Der auf der Grundlage 16S rRNA-kodierender Sequenzen rekonstruierte Maximum-Likelihood (ML) Stammbaum (Abb. 3-47) zeigte deutlich, dass die verglichenen Stämme in zwei distinkte Kladen gruppiert waren.

Klade A mit einem Bootstrapping-Wert von 90,6 % an der Basis umfasste alle Stämme der Gattung *Aneurinibacillus*; Klade B (99,7 %) enthielt ausschließlich Bakterien der Gattung *Brevibacillus*.

Die eigenen Stämme *A. migulanus* WT, weiß, Bioprotect und E1 bildeten einen Cluster zusammen mit *Aneurinibacillus migulanus* DSM 2895<sup>T</sup>. Auch *A. migulanus* transluzent wurde dieser Gruppe zugeordnet. Zusammen mit *A. aneurinilyticus* DSM 5562<sup>T</sup> (syn. *Bacillus aneurinilyticus*), welcher phänotypisch und phylogenetisch sehr ähnlich ist [SHIDA et al., 1994], bildeten sie eine mit 99,9% unterstützte Sub-Klade innerhalb Klade A. Die beiden zusätzlichen Stämme dieser Klade waren *B. brevis* NCIMB 13288 und *A. thermophilicus* DSM 10154<sup>T</sup>. *B. brevis* NCIMB 13288 wurde von GOTO et al. [2004] aufgrund von DNA-DNA Hybridisierungen als *A. danicus* reklassifiziert und zählt nicht zu den Produzenten von Gramicidin S. *A. aneurinilyticus* ist der Produzent von Gramicidin A.

Das 16S rRNA-Gen des von uns anfangs als *A. migulanus* Nr. 10 benannten Stammes zeigte größte Ähnlichkeit mit den in Klade B zusammengefassten orthologen *Brevibacillus*-Sequenzen, insbesondere des Stammes *B. choshinensis* DSM 8552<sup>T</sup>, (Bootstrapping-Wert von 91,4 % des gemeinsamen Astes). Es bestätigte sich, dass die zu Beginn vorgenommene taxonomische Klassifizierung des Stammes Nr. 10 abgeändert und er in die Gattung *Brevibacillus* eingeordnet werden muss.

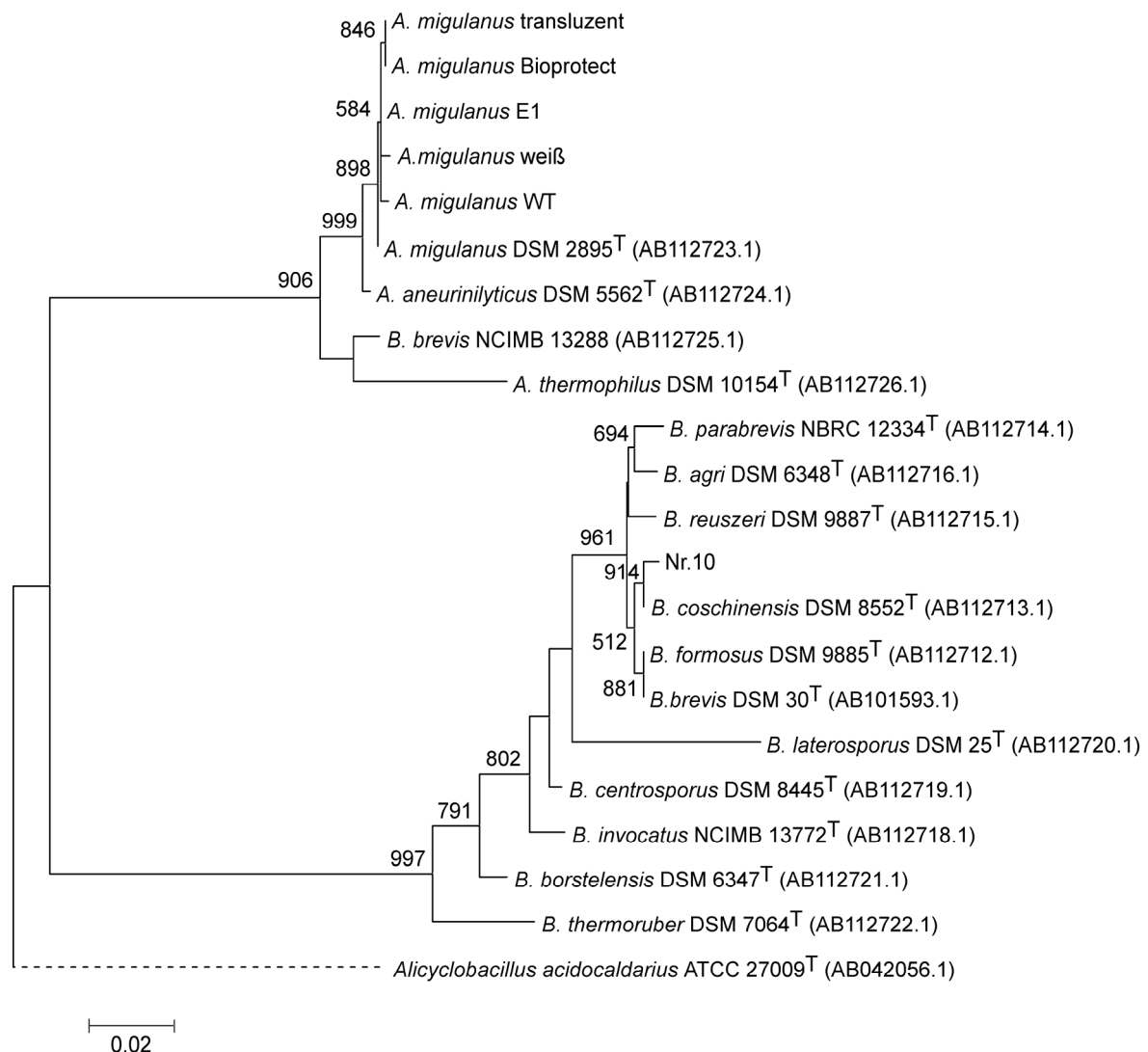


Abb. 3-47: Maximum Likelihood – Phylogramm erstellt auf Grundlage der 16S rRNA-kodierenden Sequenzen von Bakterien der Gattung *Brevibacillus* und verwandter Taxa. Zahlenangaben an internen Ästen bezeichnen Bootstrapping-Bestätigungswerte von über 50% für den entsprechenden Ast bezogen auf 1.000 Pseudoreplikationen. Die verglichenen Stämme sind mit Taxon („A.“ für *Aneurinibacillus*, „B.“ für *Brevibacillus*), Genbank-Akronym und (in Klammern) –Nummer bezeichnet. Als technische „Outgroup“ diente die orthologe Sequenz von *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009<sup>T</sup>. Der Größenstandard bezeichnet einen Sequenzunterschied von 2 % bezogen auf die Gesamtlänge des zugrundeliegenden Sequenz-Alignment; als gestrichelte Linie dargestellte Äste sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben

---

#### 3.3.8.3 p-Abstandsmatrix

Die 16S rRNA kodierenden Gene der Varianten *A. migulanus* WT, E1, weiß, Bioprotect und transluzent wiesen untereinander Sequenzidentitäten zwischen 99,6 und 100 % auf. Vollständige Sequenzidentität bestand zwischen den orthologen Sequenzen der Stämme Bioprotect, E1 und transluzent (Tab. 3-12). Die Varianten zeigten außerdem sehr hohe Sequenzübereinstimmungen (99,9 - 99,7 %) im Vergleich zur Sequenz des nächstverwandten Referenz-Stammes, *A. migulanus* DSM 2895<sup>T</sup>. Zu dem Typenstamm von *B. brevis* DSM 30<sup>T</sup> bestand eine Sequenzübereinstimmung von maximal 92,3 %.

Die Variante Nr. 10 zeigte im Phylogramm (Abb. 3-47), wie auch bei der p-Abstandsmatrix die größte Ähnlichkeit mit dem Typenstamm von *B. choshinensis* DSM 6348<sup>T</sup> (99,6 %) und war nur zu 87,8 % identisch mit dem *A. migulanus*-Typenstamm.

Der Vergleich der 16S rRNA kodierenden Sequenzen der beiden Typenstämme *A. migulanus* DSM 2895<sup>T</sup> (Klade A) und *B. brevis* DSM 30<sup>T</sup> (Klade B) ergab eine Übereinstimmung von 90,9 % (siehe Tab. 3-12). Mit dem „Outgroup“-Stamm *Al. acidocaldarius* ATCC 27009<sup>T</sup> waren die Sequenzen nur zu maximal 86,5 % identisch.

*A. aneurinilyticus* DSM 5562<sup>T</sup> wies als nächster Verwandter im Phylogramm Sequenzidentitäten von 99,1 – 99,6 % zu den *A. migulanus* Stämmen auf. Dagegen war der Sequenzunterschied zu *A. thermophilus* DSM 10 154<sup>T</sup> und *B. brevis* NCIMB 13288 (Syn. *A. danicus*) mit 98,3 - 94,7 % deutlich größer.

Tab. 3-12: Sequenzähnlichkeit, angegeben als Prozent Nukleotidsequenzidentität, zwischen den 16S rRNA kodierenden Genen eigener *A. migulanus*-Stämme und einigen Referenzstämmen aus GOTO et al [2004]. „Al.“ bezeichnet *Alicyclobacillus*, „A.“ *Aneurinibacillus* und „B.“ *Brevibacillus*.

Sequenz-Identität [%]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1) <i>Al. acidocaldarius</i> ATCC 27009 <sup>T</sup>	100												
2) <i>A. migulanus</i> DSM 2895 <sup>T</sup>	85,6	100											
3) <i>A. migulanus</i> WT	84,8	<b>99,8</b>	100										
4) <i>A. migulanus</i> E1	85,3	<b>99,9</b>	<b>99,8</b>	100									
5) <i>A. migulanus</i> weiß	84,9	<b>99,7</b>	<b>99,6</b>	<b>99,7</b>	100								
6) <i>A. migulanus</i> Bioprotect	86,5	<b>99,9</b>	<b>99,6</b>	<b>100</b>	<b>99,7</b>	100							
7) <i>A. migulanus</i> transluzent	86,2	<b>99,8</b>	<b>99,6</b>	<b>99,9</b>	<b>99,6</b>	<b>100</b>	100						
8) Nr. 10	79,1	87,8	87,6	87,5	87,2	87,9	88,2	100					
9) <i>A. aneurinilyticus</i> DSM 5562 <sup>T</sup>	85,5	99,5	99,3	99,5	99,1	99,5	99,6	87,2	100				
10) <i>A. thermophilus</i> DSM 10 154 <sup>T</sup>	86,5	95,4	94,8	95,6	94,7	96,4	96,4	86,6	95,4	100			
11) <i>B. brevis</i> DSM 30 <sup>T</sup>	84,0	90,9	<b>89,5</b>	<b>90,7</b>	<b>90,0</b>	<b>92,3</b>	<b>91,5</b>	99,1	91,0	90,1	100		
12) <i>B. brevis</i> NCIMB 13288	86,0	97,6	96,8	97,7	96,9	98,2	98,3	86,8	97,8	96,4	90,9	100	
13) <i>B. choshinensis</i> DSM 6348 <sup>T</sup>	86,0	90,5	89,2	90,3	89,6	91,7	91,0	<b>99,6</b>	90,6	89,9	99,6	90,5	100

---

### 3.4 Wirkung von *M. cordata* gegen weitere Phytopathogene

Der Extrakt aus *M. cordata* wird in Deutschland als Futtermittelzusatz von der Firma Phytobiotics GmbH kommerziell vertrieben. Da für die Inhaltsstoffe des Extraktes antimikrobielle Wirkungen beschrieben wurden, wurden Untersuchungen zur Wirkung gegen verschiedene Phytopathogene durchgeführt.

#### 3.4.1 Wirkung gegen *P. xanthii* an Gurke im Biotest

In diesem Versuch wurde die Wirkung gegen ein wichtiges Pathogen an der Gurkenpflanze, den Echten Mehltau (*Podosphaera xanthii*), untersucht. Dazu wurden je acht Pflanzen pro Variante mit dem Extrakt aus *M. cordata* (Abb. 3-48) auf beiden Blattseiten eingesprüht. Sie wurden am darauffolgenden Tag auf der Blattoberseite mit dem Pathogen inokuliert. Als Kontrollen dienten Wasser und der Resistenzinduktor Milsana® (1 %).

Der Extrakt aus *M. cordata* zeigte in keiner der eingesetzten Konzentrationen (10 – 100 µg/ml) eine Wirkung auf das Pathogen. Der Befall war bei allen Behandlungen nicht signifikant verschieden zum Befall der Wasserkontrolle (85,65 %). Die Pflanzen waren jedoch signifikant stärker befallen als die mit Milsana® behandelten Pflanzen. Hier wurde ein Wirkungsgrad von 92,15 % errechnet.

Eine Erhöhung der Konzentration des Extraktes führte zu einer Gelbfärbung der Blätter und wurde daher nicht weiter verfolgt.

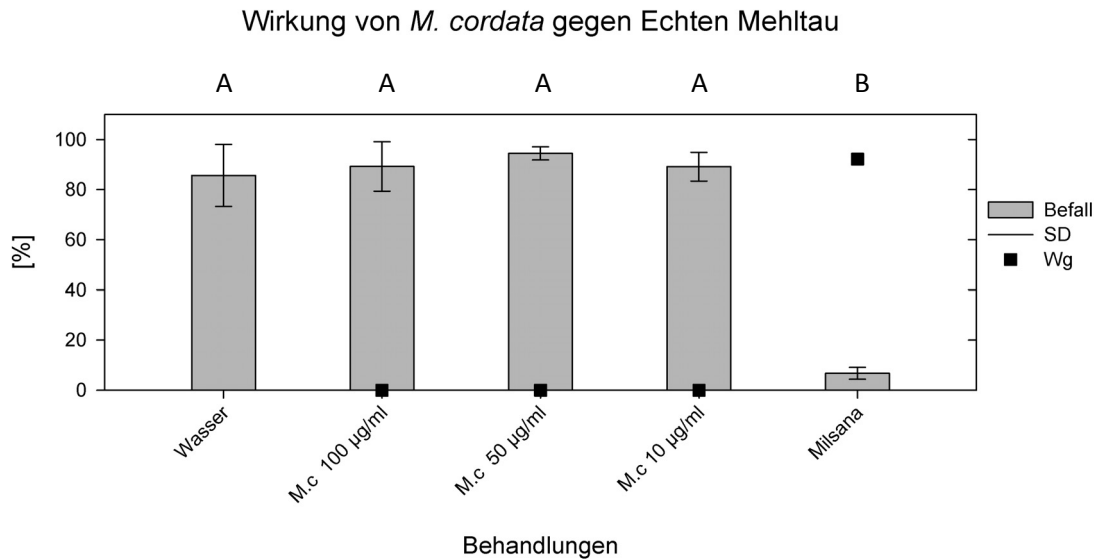


Abb. 3-48: Wirkung eines Extraktes aus *M. cordata* in verschiedenen Konzentration (10 – 100 µg/ml) gegen Echten Mehltau an Gurke; Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ), M.c = *Macleaya cordata*. SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

### 3.4.2 Wirkung als Saatgutbeizmittel gegen Möhrenschrätze

Gegen samenbürtige Erreger existieren nur wenige Präparate zur Behandlung. Eine Möglichkeit, die Erreger abzutöten, besteht in der Saatgutbeizung. In diesem Versuch wurde die Wirksamkeit des Extraktes aus *M. cordata* gegen die Möhrenschrätze (*Alternaria dauci* und *A. radicina*) untersucht. Der Extrakt wurde in den Konzentrationen 100 µg/ml und 1000 µg/ml angewendet. Als vergleichende Kontrollen wurden das chemische Fungizid Thiram® und Wasser verwendet.

Wurde der Extrakt in einer Konzentration von 100 µg/ml angewendet, so gingen insgesamt 31,9 % der ausgesäten Samen auf. Davon waren 55,4 % der Pflanzen gesund und bei 44,6 % der Pflanzen zeigten sich Krankheitssymptome. Diese Werte entsprachen in etwa denen der Wasserkontrolle (s. Tab. A-1). Wurde das Möhrensaatgut mit 1000 µg/ml Extrakt behandelt, so erhöhte sich der Aufgang an Pflanzen auf 63,3 % des Gesamtsaatgutes. Davon waren 84,2 % der Pflanzen gesund und 15,8 % mit den Erregern *A. dauci* und *A. radicina* befallen.

Die Behandlung des Saatgutes mit dem Fungizid Thiram bewirkte einen Aufgang von 76,0 % der insgesamt ausgesäten Samen, wovon 96,5 % gesunde Pflanzen waren und 3,5 % kranke.

Setzte man den Aufgang der gesunden Pflanzen der Extraktbehandlung mit dem Aufgang aller gesunden Pflanzen der chemischen Kontrolle in Bezug, so ergaben sich Wirkungsgrade von 23,2 und 72,7 % bei der Behandlung des Saatgutes mit dem 100 bzw. 1000 µg/ml

Extrakt (Ab. 3-49 und Tab. A-1). Es zeigte sich eine Steigerung der Wirkung des Extraktes, wenn er in einer höheren Konzentration eingesetzt wurde.

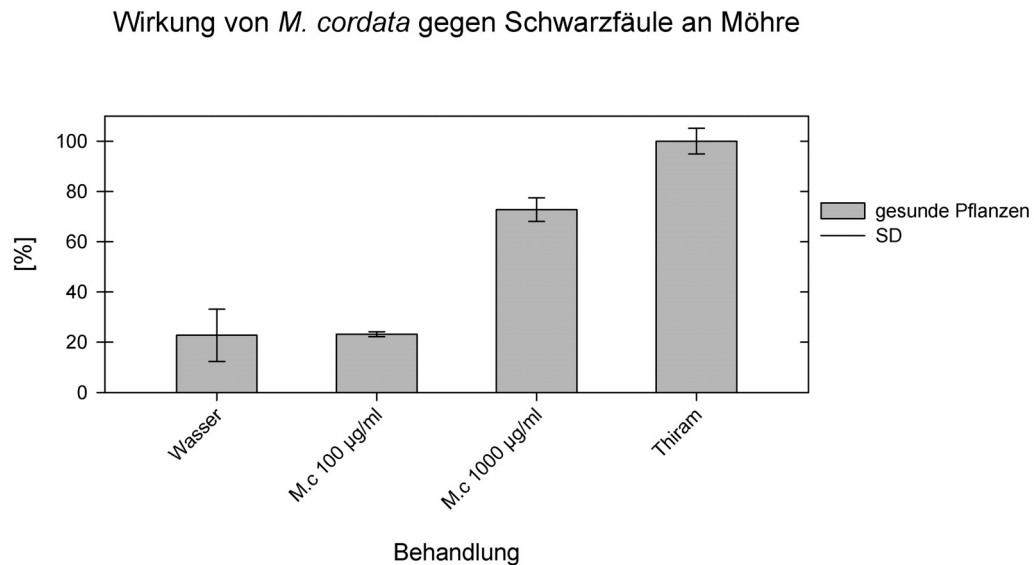


Abb. 3-49: Darstellung der Wirkung von *M. cordata* Extrakt gegen den Befall von *Alternaria dauci* und *A. radicina* an Möhrensaatgut. Der Anteil an aufgegangenen gesunden Pflanzen wurde mit dem Anteil an gesunden aufgegangenen Pflanzen der Fungizidkontrolle (Thiram) in Bezug gesetzt. SD = Standardabweichung, Wg = Wirkungsgrad.

### 3.4.3 *In vitro* Versuche gegen phytopathogene Pilze

In *in vitro* Versuchen gegen verschiedene Phytopathogene wurde der *M. cordata*-Extrakt in verschiedenen Konzentrationen in das Nährmedium eingearbeitet. Die Stärke des Wachstums wurde durch Ausmessen der Radien des Myzels bestimmt.

#### 3.4.3.1 *Botrytis cinerea*

In Abb. 3-50 ist der Versuch mit einem Extrakt aus *M. cordata* gegen *Botrytis cinerea* auf PDA Medium dargestellt. Die geringsten Konzentrationen 0,1 und 0,2 µg/ml hatten keinen Einfluss auf das Wachstum von *B. cinerea* und nach sechs Tagen war der Rand der Petrischale bei 3,9 cm erreicht. Eine Erhöhung der Konzentration bewirkte eine leichte Verzögerung des Myzelwachstums, jedoch keine Hemmung. Bei einer Konzentration von 20 µg/ml war der Pilz 3,3 cm im Radius gewachsen. Das Wachstum des Pilzes war am sechsten Tag ab einer Extraktkonzentration von 10 µg/ml signifikant verringert.



### Wirkung von *M. cordata* auf *B. cinerea*

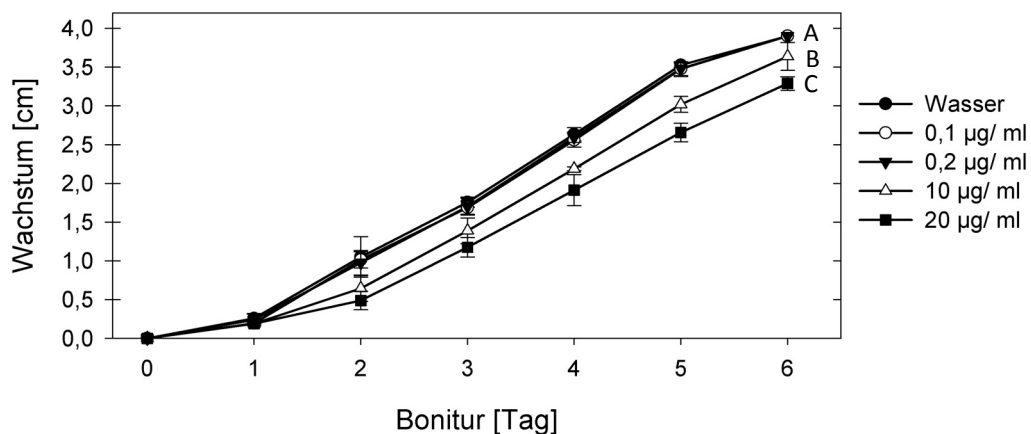


Abb. 3-50: Wirkung von einem Extrakt aus *M. cordata* in verschiedenen Konzentrationen auf das Myzelwachstum von *B. cinerea* auf PDA Medium mit Standardabweichung, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4.3.2 *Fusarium graminearum*

Die Wirkung des Extraktes aus *M. cordata* gegen *Fusarium graminearum* auf PDA Medium ist in Abb. 3-51 dargestellt. Mit den Konzentrationen 0,5 und 1 µg/ml wurde keine Verzögerung des Wachstums beobachtet. Nach 12 Tagen hatte der Pilz das Medium vollständig bewachsen. Das Myzelwachstum wurde durch die Erhöhung der Extraktkonzentration leicht verlangsamt. Mit 50 µg/ml und 100 µg/ml wuchs der Pilz 2,1 und 1,9 cm im Radius. Es konnte keine komplette Hemmung des Pilzwachstums beobachtet werden. Am letzten Auswertungstag war ab einer Extraktkonzentration von 50 µg/ml das Wachstum des Pilzes signifikant verringert.

### Wirkung von *M. cordata* auf *F. graminearum*

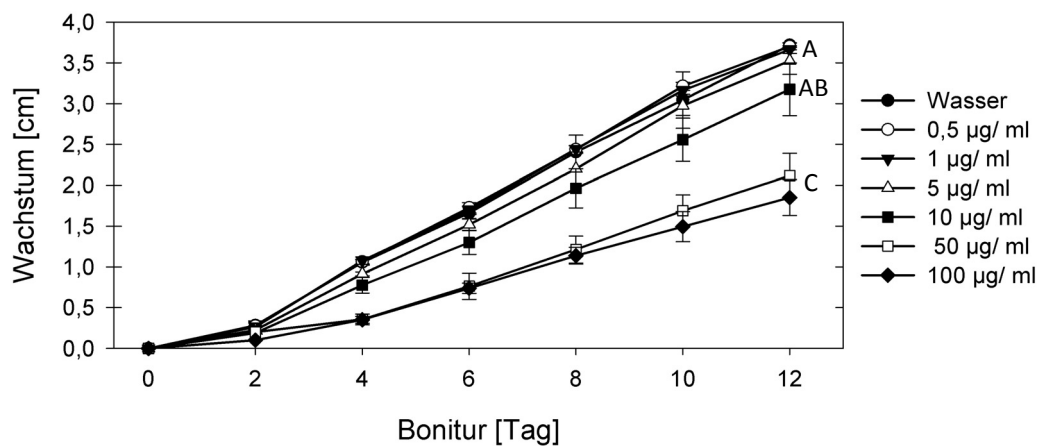


Abb. 3-51: Wirkung von *M. cordata* in verschiedenen Konzentrationen auf das Myzelwachstum von *F. graminearum* auf PDA-Medium mit Standardabweichung, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede nach einem Tuckey-Test ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4.4 *In vitro* Versuche gegen verschiedene Bakterien

In den Agardiffusionstests (Tab. 3-13) gegen die beiden Gram-negativen Bakterienspezies *Erwinia amylovora* und *Clavibacter michiganensis* konnte auch in der höchsten eingesetzten Konzentration (5000 µg/ml) keine Hemmwirkung festgestellt werden. Das Gram-positive Bakterium *A. migulanus* wurde dagegen von den Konzentrationen 1000 und 100 µg/ml im Wachstum gehemmt.

Tab. 3-13: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes aus *M. cordata* auf das Wachstum unterschiedlicher Bakterien in einem Agardiffusionstest.

	50 mg/ml	25 mg/ml	12,5 mg/ml	6 mg/ml	3 mg/ml
<i>Erwinia amylovora</i>	0 cm	0 cm	0 cm	0 cm	0 cm
<i>Clavibacter michiganensis</i>	0 cm	0 cm	0 cm	0 cm	0 cm
	1000 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	2,5	1,4	0 cm	0 cm	0 cm

---

## 4 Diskussion

---

Der Pflanzenschutz hat die Aufgabe, Kulturpflanzen vor schädigenden Einwirkungen zu schützen, damit sie ihr volles genetisches Potential ausschöpfen und hohe Erträge erzielt werden können. Heute gilt der Pflanzenschutz mit chemisch-synthetischen Präparaten zwar als das Synonym für Pflanzenschutz allgemein, jedoch ist der biologische Pflanzenschutz schon sehr viel älter [HAUG et al. 1990]. Biologische Maßnahmen werden seit der Etablierung der Ökologischen Landwirtschaft immer wichtiger. Erste historische Aufzeichnungen von Nützlingseinsätzen in Zitrusgärten lassen sich auf etwa 300 Jahre vor Christus datieren [VAN LENTEREN 2005]. Zum biologischen Pflanzenschutz zählen im weiteren Sinne neben dem Einsatz von Nützlingen auch der Einsatz von Mikroorganismen und Pflanzenextrakten gegen Schadorganismen, die Aktivierung pflanzeigener Schutzmechanismen durch Mikroorganismen oder Pflanzeninhaltsstoffe und die Nutzung von Pheromonen [STATUSBERICHT 2003]. Schon heute gibt es im Handel zahlreiche Präparate auf der Grundlage von Pflanzenextrakten oder Mikroorganismen bzw. ihren Metaboliten, die für den biologischen Pflanzenschutz eingesetzt werden können.

Im folgenden sollen Untersuchungen an zwei noch nicht kommerzialisierten Präparaten auf der Basis eines Extraktes aus *Macleaya cordata* und einer Flüssigkultur von *Aneurinibacillus migulanus* diskutiert werden.

### 4.1 Wirkung und Wirkweise des Extraktes aus *M. cordata* und der Bakterienkultur aus *A. migulanus*

#### 4.1.1 Extrakt aus *M. cordata*

Die Wirkstoffe des Pflanzenextraktes aus *Macleaya cordata* gehören zu den quartären Benzophenanthridinalkaloiden (QBA) [GARCÍA et al. 2005]. Bei *M. cordata* kommen besonders Sanguinarin und Chelerythrin in höheren Konzentrationen vor [ABIZOV et al. 2002, CHEN et al. 2009].

In den Versuchen gegen den Erreger des Falschen Mehltaus an Gurke (*P. cubensis*) ließen sich mit dem Extrakt aus *M. cordata* im Klimaraum gute Ergebnisse erzielen. Der Extrakt war schon in geringen Konzentrationen hoch wirksam. Ab einer Extraktkonzentration von 40 µg/ml wurden Wirkungsgrade von über 90 % erreicht. Erst mit höherer Verdünnung wurde eine Abnahme der Wirkung beobachtet. So wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml

---

und 5 µg/ml Wirkungen von 78,6 %, bzw. 66,4 % ermittelt. Die Wirkung gegen *P. cubensis* erwies sich als abhängig von der applizierten Konzentration.

Ursprünglich wurden Pflanzen und Pflanzenextrakte in der traditionellen Medizin verwendet. So fand auch der Extrakt aus *M. cordata* zuerst seine Anwendung in der Human- und Tiermedizin. Er hat hier z.B. eine entzündungshemmende und antimikrobielle Wirkung und kann bei oralen Entzündungsprozessen eingesetzt werden [LENFELD et al. 1981, TSCHIRNER 2004, PSOTOVA et al. 2006]. Im biologischen Pflanzenschutz tauchten Pflanzenextrakte zuerst als Insektizide auf [SCHMUTTERER & HUBER 2005]. Später wurden auch bakterizide oder fungizide Wirkungen an Pflanzen untersucht. BLAESER [1999] und LATTEN [1994] untersuchten zahlreiche Pflanzen auf ihre Eignung als Pflanzenschutzmittel. Dazu gehörten u.a. Salbei (*Salvia officinalis*) und Rhabarber (*Rheum rhabarbarum*). Die Applikation eines ethanolischen Extraktes aus Salbeiblättern erwies sich *in vitro* und *in vivo* mit einer Konzentration von 0,5 % als besonders wirksam gegen den Erreger der Braunfäule an Tomatenpflanzen [BLAESER, 1999]. Auch der Extrakt aus *R. rhabarbarum* zeigte 2,5 %ig angewendet eine sehr gute Wirksamkeit (90 %) auch bei hohem Befall in den Kontrollen [LATTEN 1994]. Ein ethanolisch gewonnener Extrakt aus den Blättern von *Glycyrrhiza glabra* war an getopften Gurkenpflanzen im Gewächshaus und an abgetrennten Tomatenblättern sowie an ganzen Pflanzen in einer 2,5 %igen Konzentration angewendet hoch wirksam gegen die Oomyceten *Pseudoperonospora cubensis* und *Phytophthora infestans* [KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS & MARKELLOU 2008, SCHUSTER et al. 2010].

Da es sich bei den dargestellten Pflanzenextrakten immer um sogenannte Rohextrakte handelte, waren hier im Vergleich zum Extrakt aus *M. cordata* noch relativ hohe Konzentrationen nötig, um Wirkungsgrade von über 90 % zu erzielen. Pflanzliche Rohextrakte werden meist durch wässrige oder ethanolische Extraktionsverfahren gewonnen und sind ein Gemisch aus unterschiedlichen Substanzen. Erst durch verschiedene Trennmethode werden die aktiven Substanzen isoliert. Im Rohextrakt aus *M. cordata* liegt der höchste Gehalt an den wirksamen Inhaltsstoffen Sanguinarin und Chelerythrin bei 2 % (bezogen auf luftgetrocknetes Blattmaterial). Dieser Wirkstoffgehalt wurde kurz vor der Knospenbildung der Pflanzen gemessen. Die Konzentration beider Wirkstoffe variiert auch in den verschiedenen Blättern und ist abhängig vom Alter der Pflanzen [ABIZOV et al. 2002, CHEN et al 2009]. Durch spezielle Extraktionsverfahren, welche bei der Firma Phytobiotics GmbH zur Gewinnung der Wirkstoffe durchgeführt werden, wurde der Gehalt an Sanguinarin im Extrakt auf durchschnittlich 60 % aufkonzentriert, woraus seine hohe Wirksamkeit bei deutlich geringerer Konzentration des Präparates resultierte. Durch die technische Aufbereitung wird eine

---

gleichbleibende Qualität des Extraktes sicher gestellt, was wiederum für die Wirksamkeit von großer Bedeutung ist.

#### 4.1.2 *A. migulanus*-Flüssigkultur

*Aneurinibacillus migulanus* (Synonym *Bacillus brevis*) wurde in England untersucht und zeigte viele Kriterien, die ihn als „Biological Control Agent“ (BCA) geeignet erscheinen lassen. Zum einen produzierte er den Metaboliten Gramicidin S, welcher an die Sporenoberfläche gebunden ist. Zum anderen wird ein „Biosurfactant“ (Bionetzmittel) in das Kulturmedium abgegeben [LAZARDIS 1981, SEDDON et al. 1997]. Auf die Charakteristika der einzelnen Bestandteile der Flüssigkultur von *A. migulanus* soll in Kapitel 4.1.2.1 eingegangen werden.

Im System *P. cubensis* an Gurkenpflanzen wurde im Klimaraum mit der unverdünnten Kulturbrühe von *Aneurinibacillus migulanus* weiß ein Wirkungsgrad von 94,3 % erreicht, mit einer 20fachen Verdünnung betrug er 43,4 %. Hier war die Wirkung gegen den Falschen Mehltau abhängig von der eingesetzten Dosis des Präparates. Die Bestimmung der Menge an Wirksubstanz dieser Kultur zeigte, dass der Gehalt an Gramicidin S in der unverdünnten Kultur bei 1240 µg/ml lag.

Viele zu den *Bacilli* gehörende Bakterien haben ein hohes Potential zum BCA. Sie sind durch ihre Fähigkeit Dauersporen zu bilden besonders gut geeignet, da sie dadurch unwirtliche Umweltbedingungen überdauern können [EDWARDS et al. 1994]. Eine erhöhte Resistenz gegenüber hohen Temperaturen, Chemikalien und radioaktiver Strahlung, ermöglicht es ihnen, unter extremen Bedingungen, wie sie z.B. auf Blattoberflächen vorkommen können, zu überleben [SEDDON et al. 1997, SCHMITT & SEDDON 2005]. Oft werden auch Metaboliten produziert, welche eine antibiotische Wirkung haben. *Bacillus thuringiensis* ist ein sehr bekannter Vertreter der Bacillen. Er bildet verschiedene kristalline Protein-Toxine (Bt-Toxine), welche sehr spezifisch gegen verschiedene Insekten (Käfer, Schmetterlinge u.a.) wirken. Bt-Toxine werden unter anderem zur biologischen Bekämpfung des Kartoffelkäfers oder von Stechmückenlarven eingesetzt [EHLERS 2006].

Neben der gezeigten Wirkung gegen *P. cubensis* an Gurkenpflanzen im Klimaraum wurden in zwei Projekten im Bundesprogramm Ökologischer Landbau weitere Wirt-Pathogen-Systeme untersucht. In SCHUSTER et al. [2010] wird die Wirkung der Bakterienkultur auch gegen die Erreger des Falschen Mehltaus an Salat und Zwiebel beschrieben. Mit einer 1:1 verdünnten Flüssigkultur von *A. migulanus* wurden gegen *Bremia lactucae* an Salatkeimlingen Wirkungsgrade von 61 bis 100 % erreicht. Die Wirkung war abhängig vom Befallsdruck und

---

der Applikationshäufigkeit des Präparates. An getopften Zwiebeln wurden Wirkungsgrade von 37 bis 95 % gegen *Peronospora destructor* erzielt. Hier war die Wirkung jedoch stark abhängig von der Zwiebelsorte, der Befallsstärke und der Latenzzeit. An für den Falschen Mehltau sehr anfälligen Sorten wurde bei hohem Befallsdruck keine Befallsverminderung beobachtet.

In gemeinsamen Versuchen mit Kollegen des JKI wurde nach guten Ergebnissen der Biotests im Klimaraum neben weiteren biologischen Agentien die Wirkung der 1:1 verdünnten Kulturbrühe aus *A. migulanus* weiß gegen den Falschen Mehltau an Gurke unter Praxisbedingungen untersucht [SCHERF et al. 2010]. Dabei wurden Versuche in einem Plastik- und einem Glasgewächshaus durchgeführt. Bei den im Plastikgewächshaus durchgeführten Versuchen wurde bei einer siebentägigen Applikation ein Wirkungsgrad von etwa 60 % erzielt. Im Versuch im Glasgewächshaus lag der Wirkungsgrad mit 92 % viel höher. In beiden Versuchen war die Kulturbrühe von *A. migulanus* ähnlich wirksam, wie das als Vergleichspräparat eingesetzte Pflanzenstärkungsmittel Elot-Vis<sup>®</sup> (Intrachem).

#### 4.1.2.1 Wirkung der einzelnen Bestandteile der Flüssigkultur

Bei der Fraktionierung einer fünf Tage alten Flüssigkultur von *A. migulanus* durch Zentrifugation in Überstand und Zellen zeigte sich, dass bei einer 1:1 Verdünnung des Überstandes und der Zellen jeweils eine Wirkung von 46,1 bzw. 76,4 % erzielt werden kann. Wurden beide Bestandteile zusammengefügt, so wurde ein Wirkungsgrad von 83,4 % erreicht. SEDDON et al. [2008] berichten von ähnlichen Beobachtungen gegen den Erreger des Grauschimmels (*Botrytis cinerea*) an Tomatenpflanzen im Folientunnel. Hier wurden Läsionen am Stengel, welche durch *B. cinerea* verursacht wurden, erfasst. Die Fraktionen, die entweder nur das Biosurfactant (Überstand) oder Gramicidin S (gewaschene Zellen) enthielten, verringerten den Befall der Pflanzen nur teilweise. Der Einsatz der gesamten Kultur führte zu einer stärkeren Befallsreduktion. SEDDON et al. [2008] beschreiben einen additiven Effekt. Vergleichende Untersuchungen mit der Gramicidinnegativmutante E1 zeigten, dass es hier mit den gewaschenen Zellen keine Wirkung gegen das Pathogen gab, da weder Gramicidin S noch Biosurfactant in dem Präparat waren [SEDDON et al. 2008]. Das bedeutet, dass an der sehr guten Wirkung der Bakterienkultur gegen *B. cinerea* und auch gegen *P. cubensis* beide Substanzen, also das Biosurfactant sowie Gramicidin S, maßgeblich beteiligt sind.

Während das Gramicidin S an die Sporenoberfläche von *A. migulanus* gebunden bleibt, wird ein „Biosurfactant“ in das Medium abgegeben [LAZARDIS 1981, EDWARDS 1993, SEDDON et

---

al. 1997]. Netzmittel, im Englischen „surfactants“, sind amphipathische Moleküle mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil, welche die Oberflächenspannung verringern können und Kohlenwasserstoffe in Wasser löslich machen [DESAI & BANAT 1997, STANGHELLINI & MILLER 1997]. Chemisch hergestellte Netzmittel werden häufig aus Petroleum gewonnen, während „Biosurfactants“ (d.h. Bionetzmittel) eine sehr diverse Gruppe von oberflächenaktiven Molekülen darstellen und von Mikroorganismen synthetisiert werden. Biosurfactants sind meist Glycolipide, Lipoproteine und Lipopeptide, Phospholipide und Fettsäuren [DESAI & BANAT 1997]. Bei dem Biosurfactant, welches von *A. migulanus* produziert wird, handelt es sich vermutlich um ein lineares Heptapeptid [SCHMITT & SEDDON 2005].

Das im Überstand vorhandene Bionetzmittel verringerte im Biotest die Dauer der Feuchtigkeit auf den Gurkenblättern, wenn die Luftfeuchte weniger als 100 % betrug. Während die Pflanzen, die mit Wasser behandelt worden waren, zwei bis drei Stunden nach der Inokulation völlig abgetrocknet waren, war die Feuchtigkeit auf den Pflanzen, welche mit der gesamten Bakterienkultur oder nur mit dem Überstand besprüht worden waren, schon nach ca. 30 min sichtbar abgetrocknet. Es zeigte sich, dass sich im System Gurke-*P. cubensis* durch ein schnelles Abtrocknen der Blätter generell eine Befallsverminderung erzielen ließ. In der Wasserkontrolle betrug der Befall mit *P. cubensis* ohne Abtrocknung 75,6 % und ließ sich durch eine Abtrocknungszeit von 120 min auf 13,1 % reduzieren. Pflanzen, die mit der Gesamtkultur von E1 behandelt wurden, wiesen nach 30 min einen Wirkungsgrad von 70,5 % gegenüber der Wasserkontrolle mit derselben Abtrocknungsdauer auf. Bei *A. migulanus* E1 handelt es sich um eine Mutante, welche kein Gramicidin S bildet. Wurden die Daten bei der Berechnung der Wirkungsgrade auf den Befall der Wasserkontrolle ohne Abtrocknungszeit bezogen, so wurde mit *A. migulanus* E1 nach 30 min Abtrocknungsdauer ein ähnlicher Wirkungsgrad wie in der Kontrolle nach 120 min Abtrocknungszeit erzielt (ca. 83 %). So lässt sich auch durch den Wirkungsgrad zeigen, dass Pflanzen, die mit dem Bakterienpräparat besprüht worden waren, schon nach 30 min den gleichen Abtrocknungsstatus wie die Wasserkontrollen nach 120 min aufwiesen.

Die semiquantitative, massenspektrometrische Untersuchung des Überstandes einer Flüssigkultur von *A. migulanus* weiß und *A. migulanus* E1 zeigte, dass Gramicidin S zwar nachgewiesen werden konnte, es aber nur in Spuren vorhanden war. Die Werte lagen jedoch an der Nachweisgrenze und dürfen daher nicht zu stark bewertet werden (persönliche Mitteilung Dr. Schütze, 2012). Um einen Wirkungsgrad von 40 % zu erzielen, war in den Biotests ein Gehalt von reinem Gramicidin S von etwa 80 µg/ml notwendig. Das war im

---

Überstand und der Probe von *A. migulanus* E1 nicht gegeben. Daher ist anzunehmen, dass andere Substanzen als reines Gramicidin S an der durchschnittlichen Wirkung von 40 %, welche in den Biotests mit dem Überstand erzielt werden konnten, verantwortlich sind. Auch EDWARDS [1993] bestimmte den Gehalt an Gramicidin S im Überstand von 12 Tage alten Flüssigkulturen. Der Anteil des Gramicidin S im Überstand betrug etwa 1 % im Vergleich zur Konzentration der *A. migulanus* Gesamtkultur. Diese geringe Menge kann aus dem Zerfall einzelner Zellen in der Kulturbrühe von *A. migulanus* herrühren.

EDWARDS [1993] untersuchte die Wirkung der Kulturbrühe von *A. migulanus* WT gegen den Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) an Chinakohl und Salat. Durch das schnellere Abtrocknen der Blätter, wurden die Konidien von *B. cinerea* an der Auskeimung gehindert, was somit einen Teil der Wirkung des Präparates ausmacht. SEDDON et al. [2008] konnten diese Beobachtung im Freiland bestätigen. Sie führten einen Versuch in Folientunneln im System *B. cinerea* an Salat durch. Sie beobachteten, dass im Herbst, wenn die Luftfeuchte regelmäßig abnahm, mit *A. migulanus* WT und *A. migulanus* E1 Wirkungsgrade von 65 – 70 % erzielt werden konnten. Im Frühjahr jedoch existierte eine andauernde hohe Luftfeuchte, so dass die Salatblätter nie vollständig abtrocknen konnten. Hier wurde nur mit der Gesamtkultur aus *A. migulanus* WT eine Befallsverminderung erzielt. Der Abtrocknungsprozess, der durch das Biosurfactant hervorgerufen wird, kam hier nicht zum Tragen und die Wirkung rührte nur von dem vorhandenen Gramicidin S her.

Oomyceten, wie z.B. *P. cubensis* oder *P. infestans*, benötigen einen über einen ausreichend langen Zeitraum andauernden Wasserfilm auf dem Blatt, um die Zoosporen aus den Sporangien zu entlassen und um erfolgreich infizieren zu können [MARX et al. 2010, SAVORY et al. 2011]. Bei entsprechenden Temperaturen beträgt der Zeitraum bei *P. cubensis* etwa 1 – 2 Stunden [COLUCCI & HOLMES, 2010], bei *P. infestans* sind es ca. 0,5 – 2 Stunden [zusammengefasst in SCHÖBER-BUTIN 2001]. Die Zoosporen von Oomyceten schwimmen dann im Wasserfilm aktiv auf einen chemischen, Nährstoff-, Ionen- oder einen elektrischen Gradienten zu [WALKER & Van WEST 2007]. Wenn die Gurkenblätter, welche nur mit dem Überstand der Bakterienkultur (ohne Gramicidin S) behandelt worden waren, schon nach etwa 30 min abgetrocknet sind, kann angenommen werden, dass allein dieser Effekt den Schlupf der Zoosporen stark beeinträchtigt. Auch die Ausbreitung der geschlüpften Zoosporen wird durch den fehlenden Feuchtigkeitsfilm verhindert. Die Abtrocknung der Blätter hat somit je nach vorherrschender Luftfeuchte einen Anteil an der Befallsverminderung.

MARX et al. [2010] untersuchten den Effekt einer gelenkten Klimaführung im Glasgewächshaus auf den Befall mit *P. cubensis* an Gurkenpflanzen. Sie fanden, dass ein



---

gezieltes Entfeuchten durch Absenken der relativen Luftfeuchte mittels Lüften im Gewächshaus ausreicht, um den Befall zu verzögern und um ihn bis zum Ende des Versuchszeitraumes signifikant zu verringern [MARX & GÄRBER 2009, MARX et al. 2010]. Ein Fokus der Bekämpfung von *P. cubensis* an der Gurke sollte also auch auf die schnellere Reduktion der Blattfeuchte gelegt werden. Eine Flüssigkultur von *A. migulanus* kann dazu einen großen Beitrag liefern.

#### 4.1.2.2 Gramicidinbestimmung mit Hilfe des Hemmhoftest

Im Biotest ließ sich mit einer dreifachen Verdünnung der Kulturbrühe von *A. migulanus* ein etwa gleich hoher Wirkungsgrad von 88 % erzielen wie im Biotest mit reinem Gramicidin S in der Konzentration von 500 µg/ml. Da dieselbe Konzentration an Wirkstoff die gleiche Wirkung auslösen sollte, so kann man annehmen, dass in der *A. migulanus* Kultur eine Ausgangskonzentration von etwa 1500 µg/ml Gramicidin S vorgelegen haben muss. Eine Bestimmung des Gramicidingehaltes der *A. migulanus* weiß Kultur wurde mittels Hemmhoftest vorgenommen und ergab einen Wert von 1240 µg/ml in der unverdünnten Kultur. Dieser Wert entspricht den Gramicidin S Angaben, die ebenfalls im Versuch mit verschiedenen Phänotypen von *A. migulanus* (WT, weiß, Bioprotect) beschrieben wurden (Kapitel 3.3.3). Anhand der Standardkurve wurden hier Gramicidin S-Gehalte von 1150 - 1295 µg/ml bestimmt.

Im Vergleich der Behandlung der Pflanzen mit reinem Gramicidin S und der Bakterien-Flüssigkultur zeigte sich, dass mit den hohen Konzentrationen (über 200 µg/ml Gramicidin S) etwa gleich hohe Wirkungsgrade erzielt wurden. Da bei der Gramicidinbestimmung mittels Hemmhoftest die Nachweisgrenze bei etwa 200 µg/ml Gramicidin S lag, wurden die Gramicidingehalte der *A. migulanus*-Kultur ausgehend von der Höchstmenge (1240 µg/ml) für die einzelnen Verdünnungen berechnet und mit dem Wirkungsgrad aus dem Biotest in Bezug gesetzt. Die sich daraus ergebende Kurve war im Bereich der niedrigen Konzentrationen etwas steiler als die von Gramicidin S. Das bedeutet, dass mit der Flüssigkultur von *A. migulanus* ein tendenziell höherer Wirkungsgrad bei gleichem Gramicidingehalt als bei Anwendung des reinen Gramicidin S erreicht werden konnte.

Es ist möglich, dass bei der Anwendung der beiden Präparate (Kulturbrühe oder reines GS) in hohen Konzentrationen die Wirkung des Gramicidin S überwiegt. Bei den niedrigen Konzentrationen könnte das sich in der Kulturbrühe befindende Bionetzmittel zusätzlich einen

---

Anteil an der Befallsverringerung haben, so dass sich hier mit einer geringeren Gramacidin S Konzentration ein vergleichsweise höherer Wirkungsgrad erzielen lässt.

Bei der Gramacidin S-Bestimmung mittels Hemmhoftest trat das Problem auf, dass die resultierende Gramacidinkonzentration, abhängig von der Verdünnungsstufe, stark variierte. Der Unterschied zwischen der unverdünnten Kultur und der 10fach verdünnten Kultur lag bei einem Faktor von 2,3. Dieses Phänomen wurde auch von WÖLFLE [2010] beschrieben. Dieser Faktor ist abhängig von den Verdünnungsstufen, welche miteinander verglichen werden. Es wurde ein Faktor von 1,6 für den Vergleich der 5fach und der unverdünnten Kultur angegeben, während es zwischen der unverdünnten Probe und der 1:1 Verdünnung keinen erheblichen Unterschied gab [WÖLFLE 2010]. Dies deutet darauf hin, dass sich Gramacidin S Moleküle in hohen Konzentrationen zu Dimeren zusammenschließen, wie es auch von linearen Gramacidinen (Gramacidin A - C) bekannt ist [WALLACE 1990, CHITTA & GROSS 2004]. JELOKHANI-NIARAKI et al. [2008] folgerten aus ihren Ergebnissen, dass sich Gramacidin S Moleküle zuerst an die „Bilayer“ anlagern und dann aufgrund verschiedener Wechselwirkungen an die Oberfläche binden. Anschließend kommt es zur Konformationsänderung und Expansion des Moleküls, wodurch es tiefer in die Membran eindringen kann und diese destabilisiert und permeabilisiert. In hohen Konzentrationen können sich mehrere Gramacidin S Moleküle in Lipid-Membranen als Oligomer zu einer „transmembrane  $\beta$ -barrel“ Pore zusammen schließen [AFONIN et al. 2008] und damit zur Permeabilisierung der Membran führen.

Zur Vorbereitung für den Hemmhoftest wurden die Sporen durch die Behandlung mit HCl und durch Hitze permeabilisiert und das Gramacidin freigesetzt. Vermutlich bleibt es dabei jedoch zum Teil an die Zellwände gebunden, so dass es nicht frei vorliegt. Für die Standardkurve zur Errechnung des Gramacidin gehaltes wurde reines Gramacidin S (FA Sigma) genutzt. Hier verhielt sich die Größe der Hemmhöfe proportional zur Konzentration von Gramacidin S, was sich in einem Bestimmtheitsmaß von 0,95 widerspiegelte. Die maximale eingesetzte Konzentration war 500  $\mu\text{g/ml}$  Gramacidin S. EDWARDS [1993] erstellte Standardgeraden im Bereich von 0 – 100  $\mu\text{M}$  (entspricht 0 – 121,4  $\mu\text{g/ml}$ ) und zeigte ebenfalls sehr gute Korrelationen zwischen der eingesetzten Konzentrationen und der Größe der Hemmhöfe. Dies deutet darauf hin, dass in der vorliegenden Arbeit die Dimerbildung erst oberhalb einer Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  auftrat. AFONIN et al. [2008] machten zur Menge, die in ihren Untersuchungen zur Dimerbildung führte, keine genaue Angabe. Sie

---

gaben jedoch einen Grenzwert bei einem Verhältnis von 1:20 Peptid zu Lipid an, was die Dimerbildung nicht allein von der Gramicidin S-Konzentration abhängig macht.

Um zu überprüfen, ob eventuelle Zellwandreste oder zu hohe Gramicidinkonzentrationen zu den Unterschieden in der Größe der Hemmhöfe im Vergleich zur Konzentration führten, können Versuche mit reinem Gramicidin S und höheren Gramicidinkonzentrationen Klarheit bringen. Auch sollte ein Vergleich mit einer massenspektrometrischen Bestimmung des Gramicidingehaltes von *A. migulanus* Flüssigkulturen in verschiedenen Konzentrationen vorgenommen werden.

Da die Dimerbildung von Gramicidin S-Molekülen in hohen Konzentrationen in den eigenen Versuchen vorzuliegen schien, wurden für die Bestimmung des Gramicidin S-Gehaltes jeweils nur die höchsten Verdünnungen der Proben heran gezogen, bei denen noch ein Hemmhof gemessen werden konnte.

#### **4.1.3 Kombination des Pflanzenextraktes mit der Bakterien-Flüssigkultur**

Bei der Anwendung einzelner Pflanzenschutzmittel beschränkt sich ihre Wirksamkeit häufig auf einzelne wenige Pathogene oder Pathogengruppen. Wird der Schutz nur durch einen Wirkmechanismus ausgelöst, kann es außerdem schnell zur Ausbildung von Resistenzen gegen dieses Pflanzenschutzmittel kommen. ZHU et al. [2007] untersuchten in einem zweijährigen Versuch in Plastikgewächshäusern die Resistenzausbildung von *P. cubensis* an Gurken gegen das systemisch wirkende Carboxylsäure-Fungizid Flumorph. Sie fanden erste resistente Populationen von *P. cubensis* schon nach sechsmaliger Anwendung von Flumorph. Die Kombination von Flumorph mit dem Präparat Mancozep erhöhte die Wirkung beider Präparate signifikant und verringerte die Ausbildung der Resistenz des Pathogens. Aber auch hier kam es nach acht aufeinanderfolgenden Anwendungen zum Auftreten resistenter Stämme. Auch biologische Präparate sind nicht vor der Entwicklung von Resistenzen geschützt. In den frühen 1990er Jahren wurden erste gegen *B. thuringiensis* resistente Insekten beschrieben [FERRÉ et al. 1991]. Gegen verschiedene Produkte, welche auf einzelnen Stämmen des Apfelwickler-Granulosevirus (CpGV) basieren, wurden seit 2003 im Freiland Apfelwicklerpopulationen mit einer geringeren Empfindlichkeit gefunden [FRITSCH et al. 2005].

Durch die Mischung mehrerer BCAs, welche durch verschiedene Wirkmechanismen agieren, besteht die Möglichkeit, die Wirkung eines Pflanzenschutzmittels zu verbessern. Der Vorteil besteht darin, dass Pathogene in unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder verschiedene

---

Pathogene gleichzeitig bekämpft werden können. Die Gefahr einer Resistenzausbildung gegen einen Wirkstoff durch das Pathogen kann dadurch vermindert, das Wirkspektrum des Präparates erhöht oder die Aufwandmenge der einzelnen Komponenten verringert werden [SCHMITT & SEDDON 2005].

Im Biotest wurde untersucht, ob der gleichzeitige Einsatz beider Präparate zu einer Wirkungsverbesserung führt. Die Mischung des Extraktes aus *M. cordata* (50 µg/ml) und der Kulturbrühe von *A. migulanus* (1:5) führte zu einer leichten, aber nicht signifikanten Verringerung des Befalls der Gurken mit Falschem Mehltau im Klimaraum im Vergleich zu den Pflanzen, welche nur mit der Bakterienkultur oder dem Pflanzenextrakt behandelt wurden. Insgesamt hatten der Extrakt und auch die Bakterienkultur für sich in den hier angewendeten Konzentrationen schon eine gute Wirkung gegen *P. cubensis* an Gurke. Es sind weitere Versuche mit einer Variation der Konzentration beider Präparate notwendig, um den Effekt der Kombination der Präparate beurteilen zu können.

In einem Agardiffusionstest wurde gezeigt, dass *A. migulanus* in seinem Wachstum durch den Extrakt aus *M. cordata* durch Konzentrationen zwischen 10 und 100 µg/ml gehemmt wird. Im durchgeführten Biotest hatte die Mischung des Überstandes der Bakterienkultur mit dem Pflanzenextrakt dieselbe gute Wirkung, wie die Mischung der gesamten Flüssigkultur mit dem Extrakt aus *M. cordata*. Es ist denkbar, dass bei der Kombination der Kultur von *A. migulanus* mit dem Extrakt aus *M. cordata* weniger das Gramicidin S an der Wirkung beteiligt war, sondern der Netzmittel-Effekt der Flüssigkultur dem Extrakt zu Gute kam. Das sich im Extrakt befindende Sanguinarin lässt sich durch Licht der Wellenlänge 560 nm fluoreszenzmikroskopisch sichtbar machen. Es zeigte sich, dass sich die Partikel des Extraktes nicht gleichmäßig auf der Blattoberfläche verteilen, sondern Agglomerate bilden (nicht gezeigt). Der Netzmittel-Effekt des Überstandes von *A. migulanus* könnte zu einer gleichmäßigeren Verteilung des Extraktes auf dem Blatt führen und durch die zusätzlich schnellere Abtrocknung den Schutz der Pflanze erhöhen.

#### **4.1.4 Wirkweisen der Präparate**

##### **4.1.4.1 Wirkung auf Oomyceten**

*In vitro* Versuche können einen ersten Anhaltspunkt zur Wirkungsweise eines Präparates bieten. *P. infestans* wächst als semibiotropher Pilz auch auf Nährmedien, so dass Untersuchungen zum Einfluss von Präparaten auf das Myzel eines Oomyceten möglich sind. Der Extrakt aus *M. cordata* hatte mit einer Konzentration von 25 µg/ml eine verlangsamende

---

Wirkung auf das Myzelwachstum von *P. infestans*. In der höchsten eingesetzten Konzentration (100 µg/ml) wurde *P. infestans* vollständig gehemmt.

Ab einer Konzentration von 25 µg/ml wirkte sich Gramicidin S ebenfalls wachstumsverlangsamend auf das Myzel von *P. infestans* aus. Jedoch wurde das Wachstum nicht vollständig gehemmt, sondern schritt nur sehr verlangsamt voran.

SEDDON et al. [1997] fanden unter *in vitro* Bedingungen eine keimhemmende Wirkung mit geringen Gramicidin S-Konzentrationen (fungizide Wirkung unter 5 µM, entspricht 6,07 µg/ml) und eine Hemmung des Myzelwachstums von *B. cinerea* auf Nährmedium durch Konzentrationen höher als 20 µM (24,28 µg/ml). Durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (SEM) zeigten SEDDON et al. [2008], dass *A. migulanus* WT auf der Pflanze den Erreger des Grauschimmels besiedelte, wodurch Gramicidin S in direkten Kontakt zum Pilz kam. Dieser Kontakt führte zur Zerstörung der Konidien von *B. cinerea*. Diese Art der Wirkung ist auch bei *P. cubensis* denkbar, muss aber noch genauer untersucht werden.

Die Untersuchung des Zoosporenschlupfes bei *P. infestans* zeigte, dass sowohl der Extrakt aus *M. cordata* (50 - 6,3 µg/ml) als auch die Bakterienkultur aus *A. migulanus* (1:1) einen hemmenden Effekt auf die Freisetzung der Zoosporen aus den Sporangien hatten. Mit der geringsten Konzentration des Pflanzenextraktes wurde nach drei Stunden ein maximaler Schlupf von 3,3 % erreicht, mit dem Bakterienpräparat wurde der Schlupf zu fast 100 % gehemmt. In beiden Versuchen war die Zoosporenentlassung von *P. infestans* in den Wasserkontrollen nicht sehr gut, da nach drei bzw. sechs Stunden erst etwa 40 % der Sporangien entleert waren. In SCHUSTER [2008] wurde die hemmende Wirkung des ethanolischen Extraktes von *Glycyrrhiza glabra* (0,31 %) auf den Schlupf von *P. infestans* gezeigt. Hier waren in der Kontrolle schon nach drei Stunden 70 % der Sporangien entleert. Der Unterschied in den Schlupfraten der Kontrollen könnte durch unterschiedlich alte Kulturen von *P. infestans* oder veränderte Versuchsbedingungen herrühren, welche scheinbar nicht optimal waren.

Bei *Phytophthora* wird die Zoosporengese (Bildung von einkernigen Zoosporen) *in vitro* durch einen Kälteschock induziert [JACKSON & HARDHAM 1996]. Die anschließende Freisetzung der meisten Zoosporen wird durch den Bruch der Apikalpapille und den Aufbau eines hydrostatischen Drucks im Inneren des Sporangiums angetrieben [GISI et al. 1979, GISI & ZENTMYER 1980]. Es wird angenommen, dass die Sporangienzellwand als semipermeable Barriere einen Influx von Wasser erlaubt, aber den Efflux osmotisch wirkender Substanzen verhindert [HARDHAM 2009]. Möglicherweise wirkten die eingesetzten Präparate

---

(Pflanzenextrakt und Bakterienpräparat) unter *in vitro* Bedingungen störend auf die Zoosporengenesse oder konnten den Aufbau des für die Freisetzung der Zoosporen nötigen osmotischen Druckes verhindern. Es ist auch möglich, dass die Präparate einen Einfluss auf das sogenannte „cytoplasmatic cleavage“ haben. Dabei kommt es zur Reorganisation des Cytoskeletts in den Sporangien, das Cytoplasma teilt sich auf und es werden einkernige Zoosporen gebildet. Ein Effekt auf diesen Vorgang kann mittels Immunofluoreszenz-Anfärbung untersucht werden [siehe HARDHAM 2005].

Die Zoosporen der Oomyceten sind ein sehr empfindliches Stadium in der Entwicklung des Pilzes, da sie noch keine Zellwand besitzen. Flüssigkeit dringt über Osmose ständig in die Zelle ein und wird mittels einer kontraktilen Vakuole nach außen gepumpt, da die Zellen sonst platzen würden [WALKER & Van WEST 2007]. Erst mit der Enzystierung und der Ausbildung einer Zellwand ist die Zelle in der Lage, dem Turgor stand zu halten [HARDHAM 2009]. Anzeichen für die direkte Wirkung der Präparate auf geschlüpfte Zoosporen fanden sich im eigenen *in vitro* Versuch auf Objektträgern. Die Präparate führten dazu, dass die Zoosporen unbeweglich wurden, sich abrundeten und später zerfielen. Durch den stetigen Flüssigkeitseinstrom in die Zellen hinein ist damit zu rechnen, dass die Präparate mit eingetragen werden. Sie führten vermutlich unter anderem zum Versagen der kontraktilen Vakuole, so dass überschüssige Flüssigkeit nicht mehr herausgepumpt werden konnte und die Zellen dadurch ihre Integrität verloren.

Der optische Aufheller Blankophor® bindet an Komponenten in Chitin und Zellulose der Zellwände und lässt sich durch Anregung mit UV-Licht sichtbar machen [HAMER et al. 2006]. Mit dieser Methode wurde das Schlupfverhalten der Zoosporen von *P. cubensis* auf Gurkenblattscheiben untersucht.

Nach den Behandlungen mit den Präparaten waren auf den Blättern entleerte Sporangien und überall auch geschlüpfte Zoosporen sichtbar. Zoosporen konnten nur im enzystierten Stadium angefärbt werden, da sie als frei bewegliche Zoosporen noch keine Zellwand besitzen [WALKER & Van WEST 2007, HARDHAM 2009]. Diese angefärbten Zoosporen waren zwar enzystiert, zeigten aber keine oder nur geringfügig eine Ausbildung von Keimschläuchen. Nur die Behandlung der Blattscheiben mit Wasser oder dem Überstand von *A. migulanus* führte dazu, dass auf den Blattscheiben viele der enzystierten Zoosporen längere Keimschläuche ausgebildet hatten. Die anderen Behandlungen bewirkten offenbar eine Stagnation in der Weiterentwicklung der Zoosporen und verhinderten damit die Infektion der Blattscheiben.

---

Mit Blankophor® ließ sich nicht feststellen, ob die einzelnen enzystierten Zoosporen noch lebensfähig waren oder nicht.

Im Vergleich der *in vitro* Versuche mit den Versuchen auf den Blattscheiben zeigten sich einige Unterschiede. Während auf dem Objektträger die Hemmung des Zoosporenschlupfes von *P. infestans* durch beide Präparate (*M. cordata*-Extrakt und *A. migulanus*-Kultur) bei fast 100 % lag, wurde bei *P. cubensis* auf Blattscheiben eine schwächere Hemmung des Schlupfes registriert. Ähnliche Beobachtungen wurden von EDWARDS [1993] in seinen Versuchen mit *A. migulanus* (Syn. *B. brevis*) und *Botrytis cinerea* beschrieben. Auf Objektträgern wurde die Keimung von Konidien von *B. cinerea* durch eine 15 µM Gramicidin S Lösung vollständig gehemmt, während auf der Blattoberfläche von Chinakohl (*Brassica rapa* ssp. *pekinesis*) die Hemmung der Keimung durch eine 500 µM Gramicidin S Lösung nur teilweise gelang.

EDWARDS [1993] sieht die abweichenden Ergebnisse vor allem in den Unterschieden der Versuchsbedingungen des *in vitro* Versuchs und dem Versuch *ad planta* und benennt Temperatur, Nährstoffstatus und Untergrund.

Der Untergrund könnte auch in den eigenen Versuchen eine große Rolle gespielt haben. Auf den Objektträgern war der Untergrund eben und inert und die Präparate wurden in Wasser suspendiert zugeführt. Dagegen war die Blattoberfläche uneben und die Präparate wurden wie im Biotest über Nacht antrocknen gelassen. Es gibt Hinweise darauf, dass Gramicidin S stark an organisches Material (z.B. Pflanzenmaterial oder Erdreich) bindet und dadurch in inaktivierter Form vorliegt [EDWARDS & SEDDON 1992]. Es kann angenommen werden, dass reines Gramicidin S auch an die Blattoberfläche von Gurkenpflanzen bindet, bei erneuter Benetzung mit Wasser schwer in Lösung geht und daher einen weniger hemmenden Einfluss auf die Freisetzung der Zoosporen hat. Bei der Nutzung der gesamten Flüssigkultur von *A. migulanus* hat möglicherweise das Bionetzmittel einen starken Einfluss, da es die Resuspension der Bakterien in Wasser auf dem Blatt erschwert, so dass die Sporangien von *P. cubensis* nicht vollständig von den Bakterienzellen umgeben waren. Das Netzmittel alleine hatte auf dem Blatt keinen Einfluss auf den Schlupf der Zoosporen.

Im Gegensatz zu Gramicidin S scheint der Extrakt aus *M. cordata* nicht sehr stark an die Blattoberfläche zu binden. Durch Untersuchungen zur Abwaschbarkeit des Extraktes (nicht gezeigt) wurde nachgewiesen, dass der Rohextrakt leicht vom Blatt herunter gewaschen werden kann (z.B. durch Regen). Es ist daher anzunehmen, dass der zuvor auf dem Blatt angetrocknete Extrakt sich bei erneuter Flüssigkeitszufuhr wieder leicht in Lösung bringen

---

lässt und dann wie im *in vitro* Test wirkt. Eine schwächere Wirkung des Extraktes könnte hier aus der schlechteren Verteilung des Wirkstoffes auf dem Blatt resultieren.

Generell kann ausgeschlossen werden, dass der Schlupf der Zoosporen durch die Bedingungen, welche in den Versuchen auf den Blattscheiben vorherrschten, negativ beeinflusst wurde. In den Wasserkontrollen wurden Zoosporen freigesetzt, die sich enzystierten und Keimschläuche ausbildeten. Im Vergleich der beiden angewendeten Methoden ist der Test auf Blattscheiben als aussagekräftiger zu bewerten, da er den natürlichen Bedingungen näher ist.

#### 4.1.4.2 Translaminare Wirkung

Eine systemische Wirkung zeichnet sich dadurch aus, dass die Wirkung gegen ein Pathogen auch an nichtbehandelten Pflanzenteilen sichtbar wird [RYALS et al. 1994, HALLMANN et al. 2007]. Eine Verlagerung der Wirkung innerhalb des Blattes stellt einen ersten Hinweis auf die systemische Umlagerung des Wirkstoffes oder auf eine Resistenzinduktion dar.

Es zeigte sich, dass weder der Extrakt aus *M. cordata* noch die Bakterienkultur aus *A. migulanus* eine Wirkung auf der Blattunterseite der Gurkenpflanzen hervorriefen, wenn sie auf der Blattoberseite aufgesprüht wurden. In der Pflanze fand offensichtlich keine Verlagerung der Wirkung über das Blatt statt. Auch wurde keine Wirkung auf der gegenüber liegenden Blattseite getrennt durch die Mittelrippe erzielt. Eine Verringerung des Befalls mit *P. cubensis* wurde nur dann erreicht, wenn die Präparate auf die Blattseite aufgebracht wurden, auf die später auch das Pathogen appliziert wurde. Somit zeigte sich in diesen Versuchen wiederum eine direkte Wirkung der Präparate gegen den Falschen Mehltau an der Gurke.

Die fehlende Wirkung auf den nichtbehandelten Blattseiten kann ihre Ursache in dem zu kurzen Zeitintervall zwischen Applikation der Präparate und Inokulation des Pathogens haben. SCHÖNBECK [1993] hält ein Zeitintervall von ein bis drei Tagen für notwendig, um eine Resistenz in der Pflanze zu induzieren, da Gene für die Abwehrreaktionen aktiviert und exprimiert werden müssen. In der Literatur lassen sich unterschiedliche Beispiele finden. Bei SCHNEIDER-MÜLLER [1991] erhöhte sich der relative Gehalt an verschiedenen PR-Proteinen, die als Marker für eine Resistenzinduktion stehen, schon wenige Stunden nach der Applikation eines Resistenzinduktors auf Gurkenpflanzen und nahm über einen längeren Zeitraum zu. XIA et al. [2009] wiesen in Versuchen an Gurke bei den Enzymen Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), pathogenensis-related Protein 1 (PR-1), Catalase (CAT) und einer



---

NADH Oxidase (RBOH, respiratory burst oxidative homolog) erhöhte Transkriptionsmengen mit einem Maximum bei 12 h nach Applikation des Induktors nach. Ein Zeitraum von drei Tagen wurde benötigt, um mit dem Resistenzinduktor Benzothiadiazol (BTD) Gurkenpflanzen gegen Echten Mehltau zu schützen [FRITZ 1996]. Dagegen war bei dem Extrakt aus *Reynoutria sachalinensis* nur ein sehr kurzes Intervall von wenigen Stunden erforderlich. Von diesem Knöterichextrakt ist auch bekannt, dass er nur begrenzt systemisch wirkt [HERGER 1991].

Wird anhand der Ergebnisse von SCHNEIDER-MÜLLER [1991] und XIA et al. [2009] eine Resistenzinduktion schon nach 24 h angenommen, wäre eine Reduktion des Befalls mit Falschem Mehltau auch auf den unbehandelten Blattflächen einen Tag nach der Applikation der Präparate zu erwarten gewesen. Um die Verlagerung der Wirkung im Blatt und in der Pflanze tatsächlich nachweisen oder ausschließen zu können, sind Versuche mit längerer Inkubationszeit anzustreben. Das Zeitintervall betrug in den durchgeführten Versuchen etwa 24 Stunden.

#### 4.1.4.3 Einfluss auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in Gurkenpflanzen

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gehört zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und spielt eine Rolle bei einer Reihe von Abwehrreaktionen der Pflanze bei Pathogenbefall. In geringen Mengen hat es einen direkten antimikrobiellen Einfluss auf das Pathogen, es kann die Synthese von Abwehrproteinen anschalten oder an der Modifizierung der Zellwandpolymere beteiligt sein [BRADLEY et al. 1992, PENG & KUC 1992, WU et al. 1997]. Eine massive ROS-Anhäufung kann zu einer Hypersensitiven Reaktion (HR) und dem damit verbundenen programmierten Zelltod (PCD) führen [LEVINE et al. 1994, KWAK et al. 2006]. Es konnten aber auch Signalfunktionen von ROS in der Antwort auf abiotischen Stress (z.B. zu hohe Lichtintensität, Trocken- oder Salzstress, zu hohe oder zu niedrige Temperatur) aufgezeigt werden [DAT et al. 2000, MITTLER 2002].

Mit Hilfe von 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) kann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo* in zellulärem Gewebe detektiert werden. DAB wird dabei durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abbauende Enzyme, wie Peroxidase oder Catalase, zu einem unlöslichen braunen Polymer umgewandelt [THORDAL-CHRISTENSEN et al. 1997].

In einem ersten Versuch konnte die vermehrte Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich zur Wasserkontrolle an Blattscheiben gefunden werden, die in der Flüssigkultur von *A. migulanus* oder dem Extrakt aus *M. cordata* eingelegt waren. Die stärkste Reaktion zeigten dabei die

---

Blattscheiben, welche mit einer Kultur von *A. migulanus* weiß oder E1 behandelt wurden. Über die gesamte Versuchszeit von maximal 24 Stunden blieben die Blattscheiben der Wasserkontrollen farblos, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Verletzungen durch das Ausstanzen nicht zu einer Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  führten.

Weiterführende Untersuchungen zur Differenzierung des Einflusses der einzelnen Bestandteile der Bakterienkultur zeigten, dass die Induktion vorwiegend von Substanzen im Überstand der Kultur herrühren muss. Sowohl die Behandlung der Blattscheiben mit dem Überstand von *A. migulanus* weiß als auch von E1 führte zu einer starken Braunfärbung der Blattscheiben. Wurden die Blattscheiben in die Suspension mit gewaschenen Zellen von *A. migulanus* weiß eingelegt, so reagierten sie mit einer leichten Verfärbung, welche ähnlich der Behandlung mit reinem Gramacidin S (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) war. In beiden Varianten fiel die Reaktion in den Blattscheiben jedoch viel schwächer aus als beim Überstand. Die Behandlung der Blattscheiben mit der Zellsuspension von *A. migulanus* E1 oder TSB-Medium führte zu keiner oder nur einer geringen Bildung von braunen Polymeren.

In einem Versuch, bei welchem die Präparate auf ganze Pflanzen appliziert wurden, fiel die DAB-Reaktion um vieles schwächer aus als auf den ausgestanzten und in den Präparaten eingelegten Blattscheiben. Auch konnte hier keine klare Differenzierung zwischen den einzelnen Behandlungen vorgenommen werden. Dies kann darauf beruhen, dass die Präparate nicht oder nur schwer durch die Epidermis permeierten, so dass keine bzw. nur eine schwache  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung induziert wurde, welche mit der DAB-Färbung nicht detektiert werden konnte. Anhaltspunkte dafür finden sich in den Versuchen zur Verlagerung im Blatt und zur kurativen Wirkung (Kapitel 4.1.4.2 und 4.1.4.5). Die Reaktion mit DAB war an den ausgestanzten Blattscheiben wesentlich stärker als an der Ganzpflanze, da die Mittel hier die Möglichkeit hatten, über die Schnittränder einzudringen. Im Versuch mit den getauchten Blattscheiben ist die starke Akkumulation der DAB-Polymere und die Zunahme des  $\text{H}_2\text{O}_2$  (bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -assoziierten Enzyme) daher vermutlich als phytotoxische Reaktion auf den Überstand der Bakterienkultur und auf den Pflanzenextrakt zu werten. Es kam zu einer schnellen Bildung von ROS, die schon nach 10 min Einwirkzeit sichtbar wurde. In hohen Konzentrationen wirken ROS auch als Zellgift, wenn keine Antioxidantien gebildet werden können [DAT et al. 2000, MITTLER 2002]. AZEVO & RODRIGUEZ [2012] berichten, dass große Mengen an Quecksilberionen ( $\text{Hg}^{2+}$ ) zu phytotoxischen Erscheinungen in Pflanzen führen, die sich in physiologischen Störungen und auch in einem Anstieg von ROS äußern können. Dadurch kann es auch zur Zerstörungen der Zellen kommen.

---

Von Sanguinarin, welches eines der Hauptalkaloide im Extrakt von *M. cordata* ist, sind phytotoxische Wirkungen bekannt. Es wurden Effekte auf Pflanzenzellen beobachtet, welche nicht in der Lage waren, Benzophenandrinalkaloide wie Sanguinarin, selbst herzustellen [WEISS et al. 2006]. So zeigte sich an Zellkulturen von *Arabidopsis* und *Nicotiana* kein Abbau des von außen zum Medium zugegebenen Sanguinarins, was zu einer starken Wachstumshemmung führte. Dagegen kam es bei Zellen von *Escholzia californica*, welche selbst Sanguinarin produzierten, zur Reduktion des Sanguinarins in das weniger toxische Dihydrosanguinarin durch das Enzym Sanguinarinreduktase [WEISS et al. 2006, VOGEL 2010]. In Biotests an Gurkenpflanzen im Klimaraum zeigte sich in eigenen Versuchen, dass die Anwendung des Extraktes in Konzentrationen von über 100 µg/ml zur Gelbfärbung der Blätter führte (nicht gezeigt). CHASE & SIMONE [1985] führen, neben Nekrosen und Verbrennungen, Chlorosen als typische Symptome für phytotoxische Reaktionen auf Bakterizid- oder Fungizidanwendungen auf. Im Versuch zur DAB-Färbung wurden Konzentrationen angewendet, die auf der ganzen Pflanze keine sichtbaren phytotoxischen Effekte auslösten. Jedoch kann angenommen werden, dass das Sanguinarin durch die Verletzung an den Blatträndern leichter in die Blattscheiben eindringen konnte. Dies führte vermutlich zur starken Zunahme von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Reaktion darauf.

Vom Überstand der Bakterienkultur von *A. migulanus* sind bisher keine phytotoxischen Effekte bekannt, wenn er an ganzen Pflanzen angewendet wurde. Er enthält als Bionetzmittel wirkende Substanzen, deren Struktur noch nicht genau bekannt ist. Hier sind zunächst Untersuchungen zu den Substanzen im Überstand notwendig, um genaue Schlüsse zur Wirkung im Blattgewebe ziehen zu können. Es ist wahrscheinlich, dass die ausgestanzten Blattscheiben nicht in der Lage waren, ausreichend viele Antioxidantien oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abbauende Enzyme zu bilden, so dass die ROS nicht abgebaut werden konnten.

#### 4.1.4.4 Transkriptionsanalyse von Abwehrproteinen

Um auf biotische und abiotische Reize, wie Pathogenbefall oder Umweltbedingungen, reagieren zu können, haben Pflanzen Schutzmechanismen entwickelt und können spezifische Stressantworten aktivieren [XIA et al. 2009]. Wie in Kapitel 4.1.4.3 schon beschrieben, werden ROS als Reaktion auf biotische und abiotische Faktoren in der Pflanze gebildet. Der Abbau Reaktiver Sauerstoffspezies (O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) spielt dabei eine besondere Rolle. Mit Hilfe verschiedener antioxidativer Enzyme schützen sich Pflanzen gegen die oxidative Zerstörung eigener Zellbestandteile (z.B. der Zellwand) [DURNER & KLESSIG 1995, MITTLER 2002].

---

Dazu zählen unter anderem Catalase (CAT), Glutathion-S-Transferase (GST), Peroxidasen (POD) und viele nicht-enzymatische Antioxidantien [DURNER & KLESSIG 1995, MITTLER 2002, XIA et al. 2009].

PR-Proteine wurden als Proteine in Pflanzen definiert, welche als Antwort auf Pathogenangriffe oder ähnliche Situationen induziert werden [GUEVARA-MORATO et al. 2010]. Pflanzen sind in der Lage, die Expression spezifischer PR-Gene dem Angriff spezieller Pathogene anzupassen [BONASERA et al. 2006]. Gene, die für PR-Proteine kodieren, werden häufig als Marker zur Bestimmung einer „systemic acquired resistance“ (SAR) benutzt [WARD et al. 1991].

Mittels quantitativer Real-Time PCR lässt sich die Expression verschiedener Gene in den Pflanzenzellen bestimmen. Für die Untersuchungen wurde die Expression von PR-1, GST und POD als mögliche Marker für die Induzierte Resistenz bzw. als Antwort auf phytotoxischen Stress herangezogen.

Proteine der GST-Gruppe wirken bei der Detoxifikation der Zellen mit und werden in verschiedenen Stresssituationen stärker exprimiert [MARRS 1996, WAGNER et al. 2002]. GST wirkt antioxidativ und dient der Vermeidung von Zellschäden, welche durch Pathogene verursacht wurden. Es spielt außerdem eine Rolle bei der Eingrenzung der Auswirkungen der HR [ALVAREZ et al. 1998, DUDLER et al. 1991].

Eine stärkere Expression von GST zeigte sich in den eigenen Versuchen nur bei Pflanzen, die zuvor schon mit *P. cubensis* befallen waren, mit einem Anstieg um den Faktor 2,5.

Die Induktion von GST durch Pathogene erfolgt sehr schnell, jedoch sind die Signalwege dafür noch nicht sehr gut untersucht [ALVAREZ et al. 1998, LIEBERHERR et al. 2003]. ALVAREZ et al. [1998] konnten eine sehr schnelle Zunahme der GST-Transkripte in *Arabidopsis thaliana* nachweisen. Schon ein bis sechs Stunden nach der Inokulation der Primärblätter mit dem avirulenten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. tomato (DC3000) wurde in sekundären Blättern das Maximum an Transkriptmenge erfasst. Nach acht Stunden folgte das Absinken auf den Kontrollwert. Es ist daher möglich, dass die Bestimmung der Transkriptmenge in den eigenen Versuchen (24 h nach Applikation) zu spät erfolgte und ein früherer Zeitpunkt nötig ist, um einen Anstieg von GST messen zu können.

Peroxidasen sind eine im Pflanzenreich weit verbreitete Gruppe von Enzymen, die z.B. in Vakuolen, im Tonoplasten, im Plasmalemma sowie innerhalb und außerhalb der Zellmembran zu finden sind [VITALI et al. 1998]. Sie sind beteiligt an der Hormonregulation in Pflanzen,

---

an der Kontrolle des Zellwachstums, an der Vernetzung von Polysacchariden in der Zellwand, der Ligninbiosynthese, an Suberinisierungsprozessen und an Abwehrmechanismen [FRY 1986, BRADLEY et al. 1992, VITALI et al. 1998]. Dazu zählt auch die Entfernung von freiem  $H_2O_2$  und die Oxidation von toxischen Reaktionsprodukten [YOSHIDA et al. 2002]. RASSMUSSEN et al. [1995] untersuchten in Gurke vier verschiedene cDNAs, welche für apoplastische, saure Peroxidasen kodieren. Sie fanden eine Zunahme der Peroxidasemenge nach Behandlung der Pflanzen mit dem Resistenzinduktor Salicylsäure. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der von RASSMUSSEN et al. [1995] beschriebenen sauren Peroxidase nach Behandlung mit den Präparaten untersucht.

Die Expression von POD-codierenden Genen stieg nach 24 h bei allen Varianten im Vergleich zur Kontrolle deutlich an. Die Behandlung der Pflanzen mit der Bakterienkultur führte zu einer Zunahme, die 78,9fach über der Wasserkontrolle lag, aber nach 48 h wieder auf das 1,4fache abfiel. Durch den Pflanzenextrakt wurde die Expression um den Faktor 31,6 erhöht und stieg nach 48 h noch weiter an. Pflanzen, welche zuvor schon infiziert waren, zeigten die größte Expression mit über 1000facher Erhöhung, jedoch war hier die Standardabweichung sehr groß. Bei XIA et al. [2009] kam es nach Induktorbehandlung von Gurkenpflanzen mit 24-Epi brassinolid (EBR) ebenfalls zu einer stärkeren Expression von POD, jedoch fiel sie sehr viel schwächer aus (ca. 8fach erhöht), als in den eigenen Versuchen. Dies lässt sich vermutlich mit der unterschiedlichen Versuchsanordnung erklären. RASSMUSSEN et al. [1995] wiesen den Anstieg der Expression von POD 18 h nach Inokulation von Gurkenpflanzen mit dem Pathogen *P. syringae* in sekundären, nicht behandelten Blättern nach. Daher schlossen sie auf eine Rolle von POD in der induzierten Resistenzantwort.

Die biochemische Funktion von PR-1 Proteinen ist noch weitgehend unbekannt. ALEXANDER et al. [1993] zeigten, dass eine vermehrte Bildung des Proteins in transgenem Tabak zur erhöhten Toleranz gegen *Peronospora tabaci* und *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* führte. NIDERMAN et al. [1995] demonstrierten die direkte fungizide Wirkung von PR-1 Proteinen gegen *P. infestans* an Tomaten und an Tabak unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen. PR-1 Proteine sind also direkt an der Abwehr von Oomyceten beteiligt.

Die Expression von PR-1 codierenden Genen war nach 24 h nur bei mit der *A. migulanus*-Kultur behandelten Pflanzen um das 4fache erhöht. Alle anderen Behandlungen beeinflussten die Expressionsmenge nicht. Nach 48 h nahm die Expressionsmenge bei der Behandlung mit *M. cordata* leicht zu und die von *A. migulanus* fiel auf das 2fache ab. Die Pflanzen, welche mit *P. cubensis* befallen waren, zeigten eine 9fach erhöhte PR-1-Expression im Vergleich mit der

---

Kontrolle. Die Zunahme der Expression war im Mittel nicht sehr hoch, jedoch schwankten die Werte der Versuche zwischen 3fach und 19fach erhöhter Expression sehr stark. XIA et al. [2009] zeigten eine 15fach erhöhte relative Transkriptmenge von PR-1 nach Behandlung der Gurkenpflanzen mit EBR. Dagegen wurden durch die Behandlungen mit den eigenen Präparaten nur schwache Erhöhungen der Expression bewirkt. Dies kann daran liegen, dass die Bakterienkultur und auch der Pflanzenextrakt in der Pflanze nicht als Signal für die Expression von PR-1 Genen erkannt wurden.

#### 4.1.4.5 Protektive und kurative Wirkung

Der Extrakt aus *M. cordata* und die Kulturbrühe von *A. migulanus* hatten auch in den höchsten verwendeten Konzentrationen nur eine gute Wirkung, wenn sie protektiv eingesetzt wurden. Bei einer kurativen Anwendung einen Tag nach Inokulation mit *P. cubensis* lag der Wirkungsgrad bei maximal 10,9 % und es gab keinen signifikanten Unterschied zum Befall in der Kontrolle. Dies zeigte, dass weder die Bakterienkultur noch der Pflanzenextrakt in der angewendeten Konzentration einen Einfluss auf das Pathogen hatten, sobald es sich in der Pflanze etabliert hatte.

Aus der fehlenden systemischen Wirkung kann geschlossen werden, dass beide Präparate keine oder nur eine geringe Fähigkeit haben, durch die Epidermis und Kutikula der Gurkenpflanzen zu permeieren und in das Pflanzengewebe einzudringen. Gramacidin S ist an die Sporen von *A. migulanus* gebunden [LAZARDIS 1981], was möglicherweise die Diffusion in das Blattgewebe verhindert. Ein Versuch mit reinem Gramacidin S könnte zeigen, ob in diesem Zustand die Kutikula und Epidermis überwunden werden können. Bei Sanguinarin ist es denkbar, dass dieser Stoff auf der Blattoberfläche auskristallisiert. Dies zeigte sich in eigenen mikroskopischen Untersuchungen (nicht gezeigt). BLAESER [1999] schlägt daher vor, die wirksamen Inhaltsstoffe eines Präparates durch eine entsprechende Formulierung mit penetrationsfördernden Stoffen aufzubereiten und damit die Wirkung zu verbessern. Ein Beispiel dafür ist Break-Truh<sup>®</sup>, welcher als Zusatzstoff für Spritzbrühen nicht nur die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzt, sondern auch die Aufnahme systemisch wirkender Pflanzenschutzmittel ins Blattgewebe fördern soll.

#### 4.1.4.6 Zusammenfassung der Wirkweise

Pflanzenextrakte können durch verschiedene Mechanismen auf Pflanzenpathogene einwirken. Sie können einen direkten Einfluss auf Pilze und Bakterien haben oder eine Abwehrreaktion

---

in den Pflanzen induzieren. Dieses Phänomen wird als induzierte Resistenz bezeichnet [SCHÖNBECK 1993, SCHMITT & SEDDON 2005]. Mikrobielle BCAs wirken durch den Mechanismus der Antibiose, durch die Konkurrenz um Nahrung und Platz, durch Parasitierung des Pathogens selbst (Hyperparasitismus) oder ebenfalls durch die Induktion von Resistenzen in der Pflanze [HAUG et al. 1990, SCHMITT & SEDDON 2005].

Um die Wirkweise der Präparate zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden angewendet. SCHÖNBECK [1993] und VAN LOON et al. [1998] stellten Kriterien zur Charakterisierung einer induzierten Resistenz auf. Dazu gehört das Fehlen einer direkten Wirkung des induzierenden Agens.

Aus der Untersuchung des Zoosporenschlupfes unter *in vitro* Bedingungen und auf Blattscheiben kann zunächst einmal geschlossen werden, dass sowohl der Pflanzenextrakt als auch die Bakterienkultur einen direkten Einfluss auf die Oomyceten *P. cubensis* und *P. infestans* haben. Beide Präparate zeigten auch eine hemmende Wirkung auf das Wachstum des Myzels von *P. infestans*. Dazu lassen sich in der Literatur für die Wirkstoffe Sanguinarin und Gramicidin S viele Berichte verschiedenster direkter Wirkprinzipien gegen pflanzliche und humane Pathogene finden [DZINK & SOCRANSKY 1985, LIU et al. 2009, KOSINA et al. 2010, EDWARDS 1993, RUDEN et al. 2009, HARTMANN et al. 2010].

Ein weiteres Kriterium ist die Abwesenheit einer Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit [SCHÖNBECK 1993, VAN LOON et al. 1998]. Durch die direkte Wirkung auf die Pathogene war bei beiden Präparaten auch eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit zu erwarten und konnte in den Biotests bestätigt werden. Je höher konzentriert das jeweilige Präparat eingesetzt wurde, desto größer war auch die Wirkung.

Die resistenzinduzierende Wirkung eines Präparates kann jedoch durch die direkte Wirkung einzelner Inhaltsstoffe maskiert werden. So hatte ein Rohextrakt aus *Glycyrrhiza glabra* eindeutig eine direkte Wirkung auf *P. cubensis* an Gurkenpflanzen [SCHUSTER 2008]. SCHERF [2012] fand jedoch auch Anzeichen für die Resistenzinduktion durch den ethanolischen Extrakt. Es wird vermutet, dass saure Bestandteile des Extraktes diese Reaktion induzieren. Die Ausprägung einer Induzierten Resistenz wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Durch FALKHOF et al. [1988] wurde demonstriert, dass die Induzierbarkeit der Resistenz von wechselnden Umweltbedingungen, die vor der Applikation des Resistenzinduktors auf die Pflanze wirken, abhängig ist. Hier kam es zu einer Art Konditionierung der Pflanzen. So z.B. sind ständig wechselnde Temperaturen und Lichtverhältnisse von Bedeutung, wie sie im Freiland oder Gewächshaus auftreten [FALKHOF

---

et al. 1988]. Konstante Umweltverhältnisse, wie sie z.B. im Klimaraum vorherrschten, können dagegen eine Induktion negativ beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst keine Anzeichen für die Induktion einer Systemischen Resistenz gefunden. In den Untersuchungen an ausgestanzten Blattscheiben, welche in die Präparate getaucht wurden, zeigte sich nach einer phytotoxischen Reaktion eine vermehrte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung. Wurden diese Blattscheiben auf Wasseragar ausgelegt, so löste sich das Blattgewebe auf. Diese Reaktion war besonders stark, wenn der Überstand von *A. migulanus* eingesetzt wurde. Die in der quantitativen RT-PCR gefundene Zunahme der Peroxidase-Expression (POD) kann als weiteres Indiz für die Zunahme von Stressbedingungen in der Pflanze gewertet werden, wie sie z.B. nach phytotoxischen Reaktionen auftreten. Dabei können vermehrt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder organische Peroxide gebildet werden [Van ASSCHE & CLIJSTERS 1990, AZEVO & RODRIGUEZ 2012]. Um pflanzliches Gewebe zu schützen, werden diese reaktiven Moleküle durch die Induktion von spezifischen Enzymen (z.B. Peroxidasen oder Catalasen) verringert [ELSTNER et al. 1988].

Durch die Behandlung von ganzen Pflanzen mit den Präparaten wurde nur eine leicht erhöhte Expression von PR-1 erzielt. PR-1 ist an der Abwehr der Oomyceten beteiligt [ALEXANDER et al. 1993, NIDERMAN et al. 1995]. Alle physiologischen Untersuchungen dieser Arbeit wurden jedoch ohne die Anwesenheit des Pathogens durchgeführt. In der neueren Literatur sind Prozesse beschrieben, die als Priming bezeichnet werden [BECKERS & CONRATH 2007]. Hierbei können Pflanzen durch eine Art Vorimmunisierung die Fähigkeit gewinnen, auf biotischen oder abiotischen Stress schneller oder besser zu reagieren, ohne dass diese Reaktionen bereits durch den Induktor selbst ausgelöst werden. Priming kann z.B. durch für die Pflanze nichtpathogene Mikroorganismen, die den Wurzelbereich besiedeln (z.B. *Pseudomonas* oder *Trichoderma*), ausgelöst werden. Ob durch die verwendeten Präparate ein Priming-Effekt in Gurkenpflanzen ausgelöst werden kann, muss noch weiter untersucht werden.

Die Wirkungsweise der beiden Präparate konnte in dieser Arbeit noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Weitere Untersuchungen sind anzustreben, um die genauen Wirkmechanismen herauszufinden. Im nächsten Schritt sollten sie dann für die Nutzung unter anwendungsbezogenen Bedingungen aufbereitet werden.



---

## 4.2 Phylogenetische und taxonomische Einordnung von *A. migulanus* Phänotypen

Eigene Untersuchungen ergaben, dass es nach serieller Subkultivierung von *A. migulanus* WT in Flüssigkultur zu einer Aufspaltung in mehrere, auf Festmedium separierbare Phänotypen kam. Dieses Phänomen ist nicht neu und wurde schon bei GAUSE [1946] und später bei ZHARIKOVA et al. [1964] beschrieben. Es wurden vier verschiedene Formen von *A. migulanus*-Kolonien (R, S, P<sup>+</sup>, P<sup>-</sup>) beschrieben [ZHARIKOVA et al. 1964, BERDITSCH et al. 2007]. Sie unterschieden sich in der Morphologie der Kolonie, der Begeißelung, dem Vermögen Antibiotika zu synthetisieren und in der Resistenz gegen Bakteriophagen [zusammengefasst in DOBRITSA et al. 1978].

In den Untersuchungen im JKI kam es zur Vereinzelnung einer *A. migulanus*-Kultur, welche auf 1/10 TSA transluzente Kolonien bildet. Das besondere an diesem Kolonietypus ist, dass er keine Sporen bildet. Verschiedene Parameter dieser Kolonie wurden mit dem im JKI gefundenen Stamm *A. migulanus* weiß, mit *A. migulanus* Bioprotect, der Gramicidinnegativmutante E1 und mit dem *A. migulanus* Wildtyp (WT) verglichen. Ein weiterer Typ, der als Nr. 10 beschrieben wurde und in einigen Versuchen im Biotest eine Wirkung gegen *P. cubensis* hatte, wurde ebenfalls untersucht.

Die Morphologie der Kolonien der einzelnen Stämme wurde nach Wachstum auf 1/10 TSA erfasst. Nach zwei Tagen auf 1/10 TSA hatten sich viele Einzelkolonien gebildet, welche alle in etwa gleich groß waren. Am auffälligsten waren die Kolonien von Nr. 10 und *A. migulanus* transluzent. Nr. 10 hatte im Gegensatz zu den anderen Stämmen eine kreisförmige Kolonieform und war weiß. *A. migulanus* transluzent wies nach zwei Tagen durchscheinende Kolonien mit gelapptem Rand auf.

Die Morphologie einer Bakterienkolonie wird durch Variationen der oberflächenexponierten Proteine (z.B. Pili, Flagellen, Porine, Rezeptoren), der Kapsel oder dem Zellwandaufbau bestimmt. Die meisten Änderungen führen zu einer veränderten Anordnung der Zellen innerhalb der Kolonie, wodurch die Morphologie der Kolonie bestimmt wird [VAN der WOUDE & BÄUMLER 2004]. Die Ursache für die Farblosigkeit der Kolonien der transluzenten Variante von *A. migulanus* kann im fehlenden Vermögen, Sporen zu bilden, liegen.

### 4.2.1 Fettsäureanalyse und phylogenetische Einordnung

Bei einer Fettsäureanalyse wird die Zusammensetzung von Fettsäuremethylestern in Mikroorganismen mittels Gaschromatographie untersucht. Sie kann einen ersten Überblick

---

über die systematische Einordnung geben, da die Zusammensetzung der Fettsäuren aufgrund ihrer Funktion in der Zelle hochkonserviert ist [THURLOW & GILLOCK 2005]. Es zeigte sich, dass alle als *A. migulanus* angenommenen Stämme als *A. migulanus* bestätigt wurden. Der Typ Nr. 10 wurde als *Bacillus viscosus* oder *Brevibacillus choshinensis* bestimmt. Die Ähnlichkeiten der Stämme zu einem Referenzstamm in der Datenbank von MIDI Labs [www.midi-inc.com] wird über den Similarity Index (SI) ausgedrückt. Eine exakte Übereinstimmung resultiert in einem SI-Wert von 100 %. Stämme mit einem SI-Wert größer als 50 % haben eine gute Übereinstimmung mit dem Referenzstamm [www.midi-inc.com]. Die SI-Werte der untersuchten *A. migulanus*-Stämme schwankten von 61,0 – 84,0 %, wobei *A. migulanus* E1 die geringste Ähnlichkeit im Fettsäuremuster im Vergleich zum Referenzstamm der Datenbank hatte. Der Stamm Nr. 10 wies eine 80,9 %ige Ähnlichkeit zum Referenzstamm *Brevibacillus centrosporus* und 55,1 % zum Stamm *Brevibacillus choshinensis* auf.

Unterschiede in der Beschaffenheit des Fettsäureprofils können aufgrund von unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (z.B. Temperatur und Nährmedium) auftreten. Um die Vergleichbarkeit mit den Stämmen in der Datenbank zu garantieren, wurden einheitliche Wachstumsparameter für einzelne Bakteriengruppen festgelegt [SASSER 2001]. Da es in der Anzucht der einzelnen Stämme vermutlich trotzdem zu Abweichungen kommt, ist die Ähnlichkeit, die mit den *A. migulanus* Stämmen erzielt wurde, als gut zu bewerten.

GOTO et al. [2004] untersuchten durch den Vergleich 16S rRNA kodierender Gene die phylogenetische Einordnung verschiedener Stämme von *Aneurinibacillus*- und *Brevibacillus*-Arten. Auf der Basis ausgewählter Sequenzen ergab sich eine klare Trennung in zwei, die Gattungen *Aneurinibacillus* und *Brevibacillus* repräsentierende, Kladen, welche durch die Bootstrapping-Analyse eine maximale Unterstützung von 100 % erfuhren.

Auf der Grundlage der Daten von GOTO et al. [2004] wurden die eigenen Stämme taxonomisch klassifiziert. Hierzu wurde ein ML-Stammbaum erstellt. Es ergab sich die eindeutige Aufspaltung in die Gattungen *Brevibacillus* und *Aneurinibacillus*. Die Phänotypen *A. migulanus* WT, weiß, transluzent, E1 und Bioprotect wurden mit einem Bootstrapping-Wert von 89,8 % dem Typenstamm *Aneurinibacillus migulanus* DSM 2895<sup>T</sup> zugeordnet. Da auch der Stamm *A. migulanus* transluzent in diese Klade eingeordnet wurde, kann es als bestätigt angesehen werden kann, dass auch dieser Stamm der taxonomischen Art *A. migulanus* angehört.

STACKEBRANDT & GOEBEL [1994] verglichen die Methode der DNA-DNA Hybridisierung mit der vergleichenden Analyse von 16S rRNA-Genen von Prokaryoten. Aufgrund der

---

erhaltenen Ergebnisse schlugen sie vor, bei einem Sequenzunterschied von weniger als 3 %, entsprechend einer Sequenzidentität von mehr als 97 %, zwei Bakterienstämme derselben taxonomischen Art zuzuordnen. Innerhalb der eigenen *A. migulanus*-Isolate betrugen die über eine p-Abstandsmatrix berechneten Sequenzidentitäten zwischen 99,6 und 100 %. Auch zum nächstverwandten Referenz-Stamm, *A. migulanus* DSM 2895<sup>T</sup>, wiesen sie sehr hohe Sequenzübereinstimmungen (99,9 - 99,7 %) auf. Zum Typenstamm *B. brevis* DSM 30<sup>T</sup> war die Sequenzübereinstimmung mit maximal 92,3 % sehr viel geringer.

Stamm Nr. 10 wurde, wie auch schon in der Fettsäureanalyse, mit einem Bootstrapping-Wert von 91,4 % *Brevibacillus choshinensis* DSM 8552<sup>T</sup> zugeordnet. Dieser Stamm wies außerdem in der p-Abstandsmatrix eine Sequenzidentität von 99,7 % zu *B. choshinensis* auf, so dass er dieser Art zugeordnet werden kann.

Die drei verwendeten Methoden (Fettsäureanalyse, phylogenetische Rekonstruktion, p-Abstandsmatrix) kommen somit darin überein, die eigenen Stämme mit Ausnahme des Stammes Nr. 10 der Art *A. migulanus* zuzuordnen. Grundsätzlich ist die Einordnung anhand der 16S rRNA gegenüber der Fettsäureanalyse zu bevorzugen, da diese Methode unabhängiger von äußeren Faktoren, wie z.B. der Wahl des Nährmediums ist. Im vorliegenden Fall ist das Ergebnis der Fettsäureanalyse jedoch vollauf konsistent mit der vorgenommenen molekular-taxonomischen Klassifizierung.

#### 4.2.2 Bestimmung der Anzahl der vegetativer Zellen und Sporen

Von den verschiedenen Phänotypen von *A. migulanus* wurde die Bildung von vegetativen Zellen und Sporen über einen Zeitraum von fünf Tagen beobachtet. Bei der Bestimmung der vegetativen Zellen zeigte sich, dass bei allen Kulturen nach einem Tag schon die maximale Anzahl an Zellen vorhanden war. Der Wert lag bei etwa  $6 \cdot 10^7$  cfu/ml. Bei EDWARDS [1993] waren es nach einem Tag etwa  $2,5 \cdot 10^7$  cfu/ml in TSB-Medium. Am fünften Tag war bei allen Kulturen immer noch eine Menge von  $1 \cdot 10^8$  cfu/ml vorhanden, bis auf die Flüssigkultur von *A. migulanus* transluzent. Hier war über die Zeit ein leichter Abfall der cfu/ml von  $7,4 \cdot 10^7$  auf  $2,5 \cdot 10^6$  zu verzeichnen.

Das Bakterium *A. migulanus* gehört zu den Sporenbildnern. Nach eintägiger Kultivierung in TSB betrug der Anteil an Sporen in allen Varianten ca. 10 %. Nach zwei Tagen zeigte der Stamm *A. migulanus* Bioprotect den geringsten Anteil an Sporen mit 18,1 %. In allen anderen Varianten schwankte der Anteil zwischen 30,6 und 41,6 %. Eine Ausnahme bildete der Typ *A. migulanus* transluzent, welcher keine Sporen bildete. Hier hat offensichtlich eine Mutation in

---

einem der Faktoren, die für die Sporenbildung verantwortlich sind, stattgefunden (nicht weiter untersucht). Bakteriellles Wachstum zeichnet sich durch verschiedene Phasen aus. Nach dem Start kommt es zu einer Phase exponentiellen Wachstums, welches in die stationäre Phase mündet. Danach folgt eine Endphase, in der das Wachstum abnimmt und es zum Absterben der Bakterien kommt. Da *A. migulanus* transluzent keine Sporen als Dauerformen bildete, war mit einer Abnahme der vegetativen Zellen zu rechnen.

Aus den Versuchen mit *A. migulanus* transluzent und auch aus der Literatur wird ersichtlich, dass für die Bildung von Gramicidin S die Sporenbildung nicht zwingend notwendig ist. BERDITSCH et al. [2011] und HARTMANN [2012] zeigten, dass Gramicidin S schon in den vegetativen Zellen gebildet und in einer Art Vakuole in der Zelle gespeichert wurde. Es wird angenommen, dass Gramicidin S verschiedene regulatorische Funktionen während der Dormanz der Sporen und der Sporenkeimung hat [SEDDON & NANDI 1978, MARAHIEL et al. 1979, PIRET & DEMAINE 1982, ROSENBERG et al. 1985]. EDWARDS [1993] beschrieb, dass der Metabolit schon nach einer Kultivierungsdauer von etwa 12 Stunden im Hemmhoftest nachweisbar ist. Die maximale Menge Gramicidin S von ca. 500  $\mu\text{M}$  (entspricht 607  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde bei ihm nach drei Tagen gemessen. Die Sporenbildung begann bei EDWARDS [1993] nach etwa einem Tag und erreichte ihr Maximum nach ca. vier Tagen. Eigene Versuche bestätigten, dass nach 12 Stunden Gramicidin S in Flüssigkulturen durch einen Hemmhoftest nachweisbar ist. Die Sporenbildung war jedoch schon nach zwei Tagen abgeschlossen. Diese Unterschiede können von der Kultivierungsmethoden herrühren. Durch unterschiedliche Nährmedien ließen sich die Menge an gebildetem Gramicidin S sowie die Menge an Sporen unterschiedlich beeinflussen. In NGS-Medium war z.B. die Sporenbildung sehr stark, jedoch wurde nur sehr wenig Gramicidin S (ca. 60  $\mu\text{M}$ ) produziert. In LBS+3AA Medium war die Ausbeute an Gramicidin S sehr hoch (ca. 550  $\mu\text{M}$ ), aber es wurden kaum Sporen gebildet [EDWARDS 1993]. Der Anteil an gebildeten Sporen ist bei *A. migulanus* kein gutes Kriterium, um den Gramicidingehalt abzuschätzen, da er durch Parameter wie Kultivierungsbedingungen oder Nährmedien beeinflussbar ist. Die Fähigkeit zur Sporenbildung kann jedoch ein wichtiges Kriterium für die Anwendung eines Bakterienpräparates in der Praxis sein. Durch Dauersporen können Bakterien unwirtliche Umweltbedingungen überdauern [EDWARDS et al. 1994, WALKER et al. 1998]

---

#### 4.2.3 Bestimmung des Gramicidin S-Gehaltes

In der Dünnschichtchromatographie (DC) lassen sich einzelne Bestandteile der Kultur auftrennen. Laut Prof. Dr. Seddon (persönliche Mitteilung, 2011) ist nur *A. migulanus* in der Lage Gramicidin S zu bilden. In der DC auf Cellulose ließen sich bei den Varianten *A. migulanus* WT, weiß, Bioprotect und transluzent die typischen Banden mit einem Rf-Wert von 0,9 feststellen, welche mit der Bande von Gramicidin S übereinstimmten. Bei E1 war diese Bande nicht zu sehen, da es sich hierbei um die Negativmutante handelt [NANDI & SEDDON 1978] und auch der Typ Nr. 10 produzierte kein Gramicidin S. Bei EDWARDS [1993] hatte die Gramicidin S-Bande einen niedrigeren Rf-Wert bei 0,84 und die Form seiner Banden unterschied sich von der eigenen stark. Jedoch benutzte EDWARDS [1993] Whatman Filterpapier, während in den eigenen Versuchen Platten mit Cellulosebeschichtung verwendet wurden.

Bei der Ermittlung der Gramicidin S-Gehalte von fünf Tage alten Flüssigkulturen mittels Hemmhofstest wurden bei *A. migulanus* WT, weiß und Bioprotect Mengen von durchschnittlich 1223 µg/ml errechnet. Die Kultur von *A. migulanus* transluzent produzierte mit 513,6 µg/ml etwa 50 % weniger Gramicidin S. Bei *A. migulanus* E1 und dem Phänotyp Nr. 10 wurden keine Hemmhöfe gebildet, d.h. sie produzierten kein Gramicidin.

Vergleicht man die Menge an gebildeten Gramicidin S mit der cfu/ml, welche nach fünf Tagen vorlag, so produzierte *A. migulanus* transluzent etwa zehnmal mehr Gramicidin S als *A. migulanus* WT. Ausgehend von der cfu/ml nach einem Tag Fermentation sind die Gramicidin S-Gehalte bei beiden Stämmen ähnlich. Da *A. migulanus* transluzent keine Sporen als Überdauerungsform bildet, sterben die Zellen in der Kultur zu Fermentationsende vermutlich ab. Es ist anzunehmen, dass dabei das Gramicidin S nicht verlorenght und vielleicht sogar in das Medium freigesetzt wird. Ein Hemmhofstest mit dem Überstand dieser Kultur könnte diese Hypothese bestätigen.

#### 4.2.4 Untersuchung der Wirkung im Biotest an Gurken

Im Biotest an getopften Pflanzen mit moderatem Befall in der Wasserkontrolle (74,4 %) wurden durch die Stämme *A. migulanus* WT und weiß die höchsten Befallsreduktionen erzielt. Die Wirkungsgrade betrugen hier 87,9 und 75,1 %. Mit den Typen *A. migulanus* Bioprotect und transluzent betrugen die Wirkungsgrade nur 36,6 und 48,7 %. Da *A. migulanus* transluzent nur etwa halb so viel Gramicidin S wie *A. migulanus* WT bildete, war, aufgrund

---

von vorangegangenen Untersuchungen, auch ein geringerer Wirkungsgrad zu erwarten. Durch *A. migulanus* E1 und Nr. 10 wurde der Befall mit *P. cubensis* nicht verringert. Insgesamt korrelierten die erzielten Wirkungsgrade gut mit dem Gramacidin S-Gehalt der Flüssigkulturen.

#### 4.3 Kultivierung von *A. migulanus*

In der vorliegenden Arbeit konnte keine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der Sporen und dem Gramacidin S-Gehalt gefunden werden, obwohl bekannt ist, dass Gramacidin S während der Sporulation an die Sporenwand angelagert wird [LAZARDIS 1981, EDWARDS 1993]. Dies zeigte sich besonders im Vergleich der Kultivierungsmethoden. Durch die Kultivierung von *A. migulanus* im 7 Liter Fermenter wurden etwa genauso viele vegetative Zellen und Sporen wie bei der Kultivierung im 1 Liter Erlenmeyerkolben gebildet. Jedoch war hier die Gramacidin S Konzentration immer geringer und zum Teil nicht messbar. Auch bei EDWARDS [1993] wird diese Beobachtung beschrieben. Ein Grund für die unterschiedliche Konzentration des Gramacidin S könnte in der Sauerstoffverfügbarkeit im Medium liegen. FRIEBEL & DEMAINE [1977] zeigten, dass ein zu hoher Sauerstoffgehalt im Medium zu einer Inaktivierung der Gramacidin S Synthetase führen kann und somit die Bildung des Metaboliten geringer ist. Obwohl die Produktion von Gramacidin S vor der Sporenbildung geschieht, kann angenommen werden, dass sie nicht der Auslöser dafür ist. Ein Nachweis dafür ist die Existenz verschiedener Mutanten von *A. migulanus* [NANDI & SEDDON 1978, MARAHIEL et al. 1979], welche nicht in der Lage sind, Gramacidin S zu produzieren, aber dennoch Sporen bilden [PIRET & DEMAINE 1982].

Während der Kultivierung im 7 L-Fermenter wurden verschiedene Parameter geändert, unter anderem die Sauerstoffverfügbarkeit während der Anzucht. Jedoch konnte dadurch keine Zunahme der Gramacidin S Konzentration bewirkt werden (persönliche Mitteilung Hinze, 2010/11). Derzeit wurden weitere Forschungsarbeiten zur Produktion von *A. migulanus* im Fermenter begonnen.

Da sich die Anzucht von *A. migulanus* für die Produktion größerer Mengen im 7 L-Fermenter bisher als schwierig und wenig zuverlässig herausstellte, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Anzucht auf festem Medium (TSA) untersucht. Es zeigte sich, dass dies generell möglich ist und dass die cfu/ml mit der in der Flüssigkultivierung vergleichbar oder sogar besser war.

Wenn die gesamte Kultur im Biotest gegen *P. cubensis* an Gurken verwendet wurde, so führten beide Präparate (Kultivierung aus TSB oder TSA) zu einer signifikanten Befallsverringern

---

verglichen mit der Wasserkontrolle. Die Kultivierung des Bakteriums in TSB führte jedoch zu einer besseren Wirksamkeit der Kultur. Hier könnte das enthaltene Bionetzmittel an der Verbesserung der Wirkung beteiligt gewesen sein (s. Kapitel 4.1.2.1).

Nach der Aufnahme der auf festem Medium kultivierten Bakterien in Flüssigkeit zeigte sich, dass der daraus gewonnene Überstand nach erneuter Trennung der Bestandteile (Zellen und Überstand) keinen Effekt im Biotest hatte. Das bedeutet, dass von *A. migulanus* nachträglich keine Metaboliten in die Flüssigkeit (VE-Wasser) abgegeben wurden, die eine Bionetzmittelwirkung hervorrufen können (Spreitenwirkung). Es besteht einerseits die Möglichkeit, dass bei der Kultivierung auf festem Medium kein als Bionetzmittel wirkender Stoff gebildet wird oder dass er in das feste Kulturmedium hinein diffundiert.

#### **4.4 Wirkung von *M. cordata* gegen weitere Phytopathogene**

Da der Extrakt aus *M. cordata* in Deutschland vor allem für seine Anwendung als Tierfutterzusatzstoff untersucht wurde [TSCHIRNER 2004, MOSER 2005], sollte in dieser Arbeit auch sein Spektrum exemplarisch gegen einige wichtige pflanzliche Pathogene analysiert werden. Unter *in vitro* Bedingungen wurden der *M. cordata*-Extrakt gegen die Phytopathogene *Phytophthora infestans*, *Fusarium proliferatum* und *Botrytis cinerea* getestet. Während *P. infestans* zu den Oomyceten zählt, gehören *Fusarium proliferatum* und *Botrytis cinerea* zu den Ascomyceten. Mit dem Extrakt wurden zusätzlich Untersuchungen zur Wirkung gegen *E. amylovora* und *C. michiganensis* durchgeführt.

##### **4.4.1 *In vitro* Versuche**

*P. infestans* ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln und der Braunfäule an Tomaten. Als semibiotropher Pilz wächst er auch auf Nährmedien, so dass Untersuchungen zum Einfluss von Präparaten auf das Myzel eines blattpathogenen Oomyceten möglich sind.

*Fusarium proliferatum* kommt ubiquitär im Boden und auch in Pflanzen vor. In Deutschland wurde er von Spargel isoliert; er befällt aber auch viele andere Kulturpflanzen wie Mais, Weizen oder Reis. Fusarien sind unter bestimmten Umweltbedingungen in der Lage Mykotoxine zu bilden [www.bvl.bund.de].

*Botrytis cinerea* besitzt ein Wirtsspektrum von etwa 80 Pflanzenarten. Besonders schädlich ist der nekrotrophe Pilz unter anderem für den ökologischen Weinbau, aber auch für den Tomaten- und Erdbeeranbau [www.eco-consult.net, www.oekolandbau.de B].

---

In *in vitro* Versuchen gegen die Ascomyceten *B. cinerea* und *F. graminearum* wurde mit dem Extrakt aus *M. cordata* eine Verlangsamung des Wachstums auf festem Medium beobachtet, jedoch keine vollständigen Hemmung, wie sie bei LIU et al. [2009] beschrieben wurde. Bei *F. proliferatum* wurde das Wachstum durch Konzentrationen von 50 µg/ml Pflanzenextrakt verlangsamt, bei *B. cinerea* reichten schon 20 µg/ml. LIU et al. [2009] zeigten die Wirkung der vier wichtigsten Alkaloide des Extraktes aus *M. cordata* (Sanguinarin, Chelerythrin, Protopin, α-Allocryptopin) gegen verschieden Bakterien und Pilze unter *in vitro* Bedingungen. Die mittlere hemmende Konzentration (MIC) gegen pilzliche Erreger der Gattungen *Botrytis*, *Fusarium*, *Magnaporthe* und *Rhizoctonia* betrug 0,47 – 6,13 µg/ml und war deutlich geringer als in den eigenen Versuchen. Die unterschiedlichen Ergebnisse können von den unterschiedlichen Versuchsbedingungen herrühren. LIU et al. [2009] untersuchten die Wirkung von Sanguinarin auf das Myzelwachstum in einem Ansatz mit flüssigem Medium, während die eigenen Versuche auf festem Nährmedium durchgeführt wurden. In flüssigem Medium ist der Pilz ständig vom Medium, welches das Antibiotikum Gramicidin S enthält, umgeben. Dagegen hat er die Möglichkeit auf festem Medium auch mit Luftmyzel über dem Antibiotikum zu wachsen [EDWARDS 1993]. Dies könnte die größere Menge an Pflanzenextrakt, die in den vorliegenden Versuchen benötigt wurde, erklären.

In der Untersuchung der Wirkung gegen den Oomyceten *P. infestans* konnte im Gegensatz zu den Ascomyceten eine vollständige Hemmung des Myzelwachstums beobachtet werden. BLAESER et al. [2002] beobachteten ähnliches mit einem Extrakt aus *S. officinalis*. Sie fanden eine fungistatische Wirkung gegen die Ascomyceten *A. solani* und *B. cinerea*, wogegen sie gegen *P. infestans* eine fungizide Wirkung feststellten. Dieser Effekt wurde damit begründet, dass die Hyphen von *B. cinerea* und *A. solani* durch Septen unterteilt sind. Auch die Hyphen von *F. graminearum* weisen Septen auf. Dagegen sind die Hyphen von *P. infestans* unseptiert. Es ist vorstellbar, dass in unseptierten Hyphen der Extrakt auf das ganze pilzliche Myzel wirken kann, vor allem, wenn der Pilz sich noch im Anfangsstadium seines Wachstums befindet. Dagegen werden bei septierten Pilzen nur einzelne Zellen abgetötet, jedoch nicht das gesamte Pilzmyzel. So kann der Nährboden vom Myzel nach einem längeren Zeitraum vollständig überwachsen werden.

In der Literatur finden sich viele Berichte, in denen die Wirkung der Wirksubstanzen von *M. cordata* (Sanguinarin, Chelerythrin) gegen humanpathogene Bakterien beschrieben wurde. Dazu zählen unter anderem *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* oder Bakterien, die Plaques auf Zähnen bilden [LENFELD et al. 1982, DZINK & SOCRANSKY 1985, KOSINA et al. 2010].



---

In einem ersten Versuch wurde die Wirkung des Pflanzenextraktes gegen das Gram-positive Bakterium *A. migulanus* WT getestet. Es zeigte sich, dass das Wachstum des Bakteriums ab einer Konzentration von 10 µg/ml gehemmt wird. Gegen die Gram-negativen, phytopathogenen Bakterien *E. amylovora* und *C. michiganensis* wurde im Agardiffusionstest mit der höchsten eingesetzten Konzentration (50000 µg/ml) keine Hemmung erzielt.

LIU et al. [2009] fanden dagegen eine sehr starke antimikrobielle Wirkung durch Sanguinarin mit einer MIC (minimum inhibitory concentration) von 8,0 – 16,0 µg/ml gegen die Phytopathogene *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas lachrymans* und *Xanthomonas vesicatoria* in einem Test in flüssigem Medium. Auch bei DZINK & SOCRANSKY [1985] wurde eine MIC von 1,0 – 16,0 µg/ml von Sanguinarin bei 98 % ihrer untersuchten Isolate beschrieben, bei denen es sich um Gram-positive und -negative Bakterien handelte.

Da eine Wirkung gegen Gram-positive und -negative Bakterien zu bestehen scheint, wäre auch die Hemmung der untersuchten phytopathogenen Bakterien zu erwarten gewesen.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, welche unter *in vitro* Bedingungen gegen verschiedene phytopathogene Pilze in eigenen Versuchen wie auch bei LIU et al. [2009] erzielt wurden, dass der Extrakt aus *M. cordata* ein großes Potential als Fungizid besitzt. Die Wirkung auf phytopathogene Bakterien muss weiter überprüft werden.

Für eine erste Untersuchung der Wirkung von Präparaten gegen Pathogene eignen sich *in vitro* Versuche sehr gut. Da sie kostengünstig und weniger zeitaufwendig sind, bieten sie die Möglichkeit, ein breites Substanzspektrum zu untersuchen [BLAESER 1999]. Nachteilig dabei ist, dass keine Aussage über eine Wirkung *ad planta* getroffen werden kann. Einerseits ist es möglich, dass die Präparate bei Applikation auf eine Pflanze keine Wirkung auf das Pathogen haben, wie es z.B. bei BLAESER [1999] beobachtet wurde. Andererseits gibt es Substanzen, die nur in Verbindung mit der Pflanze zur vollen Wirksamkeit kommen können [SCHÖNBECK 1993]. Dazu zählen z.B. Resistenzinduktoren. Für die spätere Anwendung muss außerdem die Pflanzenverträglichkeit (Phytotoxizität) überprüft werden. Der Pflanzenextrakt zeigte *in vitro* mit zunehmender Konzentration wachstumshemmende Wirkungen gegen die Pilze *B. cinerea*, *F. graminearum* und *P. infestans*. Um diese Effekte auf Nährmedium für die Praxistauglichkeit zu bestätigen, sind Untersuchungen an den jeweiligen Wirtspflanzen notwendig.

---

#### 4.4.2 Versuche *ad planta*

##### 4.4.2.1 Wirkung gegen *P. xanthii*

Gegen den Erreger des Echten Mehltaus an der Gurke (*Podosphaera xanthii*) konnte im Gewächshaus nach einer einmaligen, protektiven Anwendung des Extraktes aus *M. cordata* (höchste angewendete Konzentration 100 µg/ml) keine hemmende Wirkung auf das Pathogen beobachtet werden. Dies steht im Gegensatz zu Berichten von NEWMANN et al. [1999]. Sie untersuchten ebenfalls in einem Gewächshausversuch die Wirkung eines Extraktes aus *M. cordata* auf seine Wirksamkeit gegen den Erreger des Echten Mehltaus an Rosen (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*). Die Applikation des Extraktes erfolgte in einem 10tägigen Rhythmus und die Pflanzen zeigten zu Beginn der Spritzung schon einen Befall von mindestens 20 %. NEWMANN et al. [1999] erfassten einen starken Rückgang des Befalls schon nach der ersten Spritzung. In allen Behandlungen inklusive der Wasserbehandlung sank der Befall dabei auf 70 % des Ausgangsbefalles. Nach 15 Tagen waren Pflanzen, welche mit 150 oder 300 µg/ml QBA-Fungizid behandelt worden waren, signifikant geringer befallen als die Kontrollpflanzen. Der Befall betrug nur noch ca. 5 – 20 % des Anfangsbefalls.

Während NEWMANN et al. [1999] das Präparat direkt auf das Pathogen applizierten, wurde im eigenen Versuch der Extrakt aus *M. cordata* nur einmal protektiv (1 Tag vor der Infektion) ausgebracht. Da die Hyphen des Echten Mehltaus auf der Blattoberfläche wachsen, kann eine direkte Applikation des Präparates bei NEWMANN et al. [1999] zu einer starken Schädigung des Pilzes geführt haben, so dass er in Wachstum und Ausbreitung gehemmt wurde. Daher wurde auch ein eigener Versuch zur kurativen Wirkung des Extraktes aus *M. cordata* durchgeführt (nicht gezeigt), in welchem nach einmaliger Applikation keine kurative Wirkung festgestellt wurde.

Einen starken Einfluss auf die Wirkung eines Präparates haben die Oberflächenbehaarung, die Blattstellung, die Blattbehaarung sowie die Art der Wachse, welche auf die Kutikula aufgelagert sind [WALTER et al. 1977]. Rosenblätter sind im Gegensatz zu Gurkenblättern weniger behaart und besitzen eine stärkere Wachsschicht. Auch wurde von NEWMANN et al. [1999] nach eigenen Angaben eine *M. cordata* Fungizid-Formulierung (Camas Technology, Broomfield) genutzt, bei der nicht ganz klar ist, ob es sich hierbei um reine QBAs oder noch weitere Zusatzstoffe handelte. Dadurch können auch die angewendeten Konzentrationen nicht miteinander verglichen werden.

Von GAY et al. [1985] wurde eine Barriere auf der Konidienoberfläche und den Keimschläuchen der Echten Mehltäupilze beschrieben, welche die Pilze vor Austrocknung und schädlichen Agenzien, wie z.B. Fungiziden, schützen kann. Es ist möglich, dass der Extrakt aus

---

*M. cordata* den Echten Mehltau-Erreger während der Keimung daher nur wenig penetrieren konnte.

Zusatzstoffe können durch Verbesserung der Verteilung und der Haftung oder durch Verlängerung der Persistenz auf der Pflanze eine Steigerung der Wirksamkeit eines Pflanzenschutzmittels hervorrufen [EG Nr. 1107/2009]. So ist es auch denkbar, dass eine Formulierung des Extraktes aus *M. cordata* zu einer Wirkung gegen *P. xanthii* an Gurke führen könnte.

#### 4.4.2.2 Wirkung als Saatgutbeizmittel gegen Möhrenschräge

*Alternaria dauci* und *Alternaria radicina* sind wichtige Krankheiten im Möhrenanbau, welche beizeitigem Auftreten im Feld hohe Schäden verursachen oder später im Lager zu großen Verlusten führen [JAHN et al. 2007]. Im konventionellen Anbau werden chemisch-synthetische Beizmittel zur Bekämpfung eingesetzt, welche im ökologischen Anbau nicht erlaubt sind. Daher wird hier auf physikalische Methoden, wie z.B. Heißwasser- oder Heißluftbehandlungen, zurückgegriffen. Mit ihnen lassen sich bei richtiger Anwendung sehr gute Ergebnisse erzielen [STOVE]. Aber auch biologische Mittel, wie Pflanzenextrakte und antagonistische Mikroorganismen, bieten ein großes Potential als Beizmittel, besonders im Ökolandbau.

Erste Versuche der Saatgutbeizung von *Daucus carota* mit dem Extrakt aus *M. cordata* in einer Konzentration von 100 µg/ml führten zu keiner Befallsverringerung im Vergleich zu mit Wasser behandeltem Saatgut. Eine Erhöhung der Extraktkonzentration auf 1000 µg/ml führte zu einer Verbesserung der Keimrate und zur Erhöhung der Anzahl gesunder Pflanzen. Im Vergleich mit der Wasserkontrolle steigerte sich der Aufgang an Pflanzen insgesamt von 26,8 % auf 63,3 % und der Anteil gesunder Pflanzen erhöhte sich von 63,7 % auf 84,2 %. Die Wirkung war in diesen Versuchen jedoch stets schlechter als die nach chemischer Beizung mit Thiram (1%). Der Extrakt erreichte in der höchsten Konzentration (1000 µg/ml) eine Wirkung, die 70,2 % der chemischen Kontrolle entsprach.

Die im STOVE-Projekt untersuchten physikalischen Behandlungsmethoden führten zu einer Steigerung des Mehraufganges gesunder Pflanzen von 6,7 % auf 73,7 % im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle [STOVE]. Dies entspricht in etwa dem Wert, welcher sich im eigenen Versuch mit dem höchstkonzentrierten Extrakt (1000 µg/ml) erzielen ließ.

Im eigenen Versuch wurde das selbe Saatgut wie im STOVE Projekt genutzt. Jedoch hatten die Pathogene über die Jahre trotz Lagerung im Kühlschrank an Infektiosität verloren, was

---

sich im Anfangsbefall der Kontrollen widerspiegelte. Während im STOVE-Projekt durchschnittlich 9,3 % der unbehandelten Samen aufliefen, waren es im eigenen Versuch 26,8 %. Trotzdem kann hier die Wirkung des *M. cordata*-Extraktes als gut angesehen werden. Um die Wirkung auch im Freiland zu bestätigen, sind Untersuchungen unter Praxisbedingungen anzustreben.

Zusammenfassend zeigte der Extrakt aus *M. cordata* eine sehr gute Wirkung gegen die Oomyceten *P. cubensis* im Klimaraum (s. Kapitel 3.1.1) und *P. infestans* unter *in vitro* Bedingungen (s. Kapitel 3.1.10). Eine Wirkung gegen die Erreger des Falschen Mehltaus an anderen Kulturen ist nicht auszuschließen und sollte daher in weiteren Untersuchungen verfolgt werden. Auch die Nutzbarkeit als Beizmittel gegen samenbürtige Pathogene ist möglich und sollte weiter untersucht werden.

---

## 5 Zusammenfassung

---

Mikroorganismen und aus Pflanzen gewonnene Naturstoffe können zur Bekämpfung von Phytopathogenen genutzt werden. In der Literatur lassen sich zahlreiche Beispiele dafür finden. Ziel der Arbeit war es, die Bakterienkultur aus *Aneurinibacillus migulanus* und einen Pflanzenextrakt aus Federmohn (*Macleaya cordata*) auf ihre Wirksamkeit gegen den Falschen Mehltau an Gurke verursacht durch *Pseudoperonospora cubensis* und die bestehenden Wirkmechanismen hin zu untersuchen. Zusätzlich sollten weitere Phytopathogene identifiziert werden, gegen die der Federmohnextrakt wirksam ist. Für die Bakterienkultur wurde die Möglichkeit der Kultivierung auf festem Medium überprüft. Es wurden außerdem vergleichende Untersuchungen verschiedener Phänotypen von *A. migulanus* durchgeführt.

Der Extrakt aus *M. cordata* wurde von der Firma Phytobiotics GmbH in einem speziellen Verfahren hergestellt. Dieses Verfahren enthielt auch die Aufkonzentrierung der wirksamen Substanz (Sanguinarin) auf durchschnittlich 60 %. Daher waren nur sehr geringe Mengen nötig, um einen hohen Wirkungsgrad gegen *P. cubensis* an Gurkenpflanzen im Biotest (Klimaraum) zu erzielen. Schon 40 – 50 µg/ml Extrakt waren ausreichend, um den Befall bei protektiver Anwendung um 90 % zu reduzieren. Mit der Flüssigkultur von *A. migulanus* ließ sich in dreifacher Verdünnung eine sehr gute protektive Wirkung von ca. 90 % erreichen. Diese Verdünnung entsprach ca. 200 µg/ml Gramicidin S, welches als Metabolit vom Bakterium gebildet wird und dem die hauptsächliche Wirkung zugeschrieben wird. Neben diesem Metaboliten gibt *A. migulanus* auch eine als Bionetzmittel wirkende Substanz in das Kulturmedium ab. Sie bewirkt, dass die Oberflächenspannung von Wasser gesenkt wird und die Pflanzen nach dem Benetzen schneller abtrocknen. Gurkenpflanzen, die mit der Kultur des *A. migulanus* E1-Stammes (bildet kein Gramicidin S) behandelt wurden, waren im Gegensatz zu den wasserbehandelten Pflanzen schon nach 30 min vollständig abgetrocknet. Dieser Abtrocknungseffekt bewirkte eine Verringerung des Befalls um ca. 71 % gegenüber der Kontrolle mit der selben Abtrocknungsdauer.

Die Mischung des Extraktes aus *M. cordata* (50 µg/ml) und der Kulturbrühe von *A. migulanus* (1:5) führte zu einer nicht signifikanten Verbesserung der Wirkung der Mischungspartner.

Von den Hauptwirkstoffen beider Präparate (Sanguinarin und Gramicidin S) sind zahlreiche direkte Wirkungen gegen Bakterien und Pilze beschrieben worden. In den eigenen Versuchen verringerten der Pflanzenextrakt sowie die Bakterienkultur den Schlupf und das Überleben der Zoosporen von *P. infestans* unter *in vitro* Bedingungen. In einem entsprechenden Versuch auf Blattscheiben bildeten geschlüpfte und enzystierte Zoosporen von *P. cubensis* nur wenige

---

oder keine Keimschläuche aus. Auch das Myzelwachstum des auf Medium kultivierbaren Oomyceten *P. infestans* wurde durch Gramicidin S und den Pflanzenextrakt gehemmt. Neben der direkten Wirkung auf das Pathogen kann ein Präparat auch durch eine Induktion einer Resistenz in der Pflanze wirken. Mit Untersuchungen dazu wurde begonnen. Durch DAB-Färbung wurde eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen, die vor allem nach Behandlung von ausgestanzten Blattscheiben mit dem Überstand der Kultur von *A. migulanus* wie auch mit dem Pflanzenextrakt beobachtet wurde. Wurden die Blattscheiben mit gewaschenen Bakterienzellen oder dem Metaboliten Gramicidin S behandelt, trat keine starke Reaktion auf. Die Expression von an Stressantworten beteiligten Enzymen mittels quantitativer Real-Time PCR zeigte eine starke Steigerung von Peroxidase kodierenden Genen (POD). Bei Pathogenesis Related Protein-1 kodierenden Genen (PR-1), wurde nur ein leichter Anstieg verglichen mit der Kontrolle beobachtet. Obwohl die Ergebnisse die direkte Wirkung der Präparate eindeutig belegen, kann die Resistenzinduktion nicht völlig ausgeschlossen werden. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig.

Durch mehrfache Kultivierung der Bakterienkultur in flüssigem TSB-Medium kam es zur Aufspaltung in verschiedene Phänotypen. Es wurde ein Stamm *A. migulanus* weiß isoliert, der dem Wildtyp in Kolonieform, Sporenbildung und Metabolitenproduktion sehr ähnlich war. Ein weiterer Stamm mit untypischer Morphologie fiel auf, dessen Kolonien durchscheinend waren. Er bildete insgesamt weniger Zellen und keine Sporen, war jedoch in der Lage Gramicidin S zu produzieren. Durch phylogenetische Analyse der 16S rRNA kodierenden Gene wurden beide Stämme dem *A. migulanus*-Typenstamm (DSM 2895<sup>T</sup>) zugeordnet, was durch Sequenzähnlichkeiten von 99,9 – 99,7 % in der p-Abstandsmatrix unterstützt wurde.

Für die Anwendung in der Praxis werden große Mengen der Kulturbrühe von *A. migulanus* benötigt. Vorangegangene Untersuchungen zur Kultivierung ergaben jedoch, dass es bisher schwierig ist, das Bakterium im Flüssigfermenter (7 L) zu fermentieren. Das Problem bestand darin, dass *A. migulanus* hier zwar Sporen bildete, aber nur sehr wenig Gramicidin S produzierte. In eigenen Versuchen war die Kultivierung auf festem Medium dagegen problemlos möglich und es konnten vergleichbare Gramicidin S-Ausbeuten wie bei der Kultivierung im 1 L-Erlenmeyerkolben (200 ml TSB) erzielt werden. Der Nachteil dieser Kultivierungsmethode bestand jedoch darin, dass kein Bionetzmittel „geerntet“ werden konnte, da dieses entweder nicht gebildet wurde oder in das Nährmedium hinein diffundierte.

---

Die Wirkung dieser Präparate beruht demgemäß ausschließlich auf dem produzierten Metaboliten.

Der Extrakt aus *M. cordata* wird in Deutschland als Zusatzstoff für Tierfutter verkauft (Phytobiotics GmbH) und es ist wenig über das Wirkspektrum gegen Phytopathogene bekannt. Neben der sehr guten Wirkung gegen Falschen Mehltau-Pilze konnte keine Wirkung gegen den Erreger des Echten Gurkenmehltaus (*Podosphaera xanthii*) gefunden werden. Es zeigte sich jedoch, dass in hohen Konzentrationen von 1000 µg/ml eine Wirkung gegen Möhrenschrätze (*Alternaria dauci* und *A. radicina*) an Möhrensaatgut besteht. Daher ist der Einsatz als Saatgutbeizmittel denkbar. In *in vitro* Versuchen auf Nährmedium wurden die Pilze *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* und *Phytophthora infestans* durch Konzentrationen von 20 - 50 µg/ml im Wachstum gehemmt. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen bieten Anhaltspunkte für das Wirkspektrum des Extraktes aus *M. cordata*. Versuche an ganzen Pflanzen unter kontrollierten und unter Praxisbedingungen sollten folgen, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

---

## 6 Summary

---

Numerous examples can be found in literature for the use of microorganisms and natural products from plants as control agents against phytopathogens. It was the aim of the present doctoral thesis to study the efficacy and mode of action of both a bacterial culture of *Aneurinibacillus migulanus* and a plant extract of plume poppy (*Macleaya cordata*) against downy mildew on cucumber caused by the oomycete fungus, *Pseudoperonospora cubensis*. With the plant extract, additional investigations of effects against further phytopathogens were performed. For the bacterial culture, growth was tested on solid medium in addition to liquid cultivation. Furthermore, comparative investigations with different phenotypes of *A. migulanus* were undertaken.

The plant extract from *M. cordata* is produced by Phytobiotics GmbH using an optimized process including the upgrading of the active ingredient (Sanguinarin) to about 60%. At low concentrations of 40 - 50 µg/ml, the upgraded extract gave rise to a 90% reduction of the infestation of cucumber with *P. cubensis* in bioassays after protective treatment. With a threefold diluted liquid culture of *A. migulanus*, a very good efficacy of about 90% could be reached when applied protectively. This dilution corresponded to about 200 µg/ml gramicidin S, an antimicrobially active metabolite produced by *A. migulanus*. Together with the metabolite a biosurfactant is produced by the bacterium and released into the culture broth. The surfactant reduces surface tension of water and leads to a faster drying of plants after wetting. The treatment of cucumber plants with a culture of *A. migulanus* mutant E1 (no production of gramicidin S) causes a faster drying of the leaves. After 30 min plants were completely dry in contrast to water treated plants. This effect led to a reduction of the infestation of about 71% as compared to the water control after the same time of drying. Combination of the extract of *M. cordata* (50 µg/ml) and the bacterial preparation of *A. migulanus* (1:5) resulted in a non-significant improvement over the efficacy of both single preparations.

For both active substances (sanguinarin and gramicidin S) of the investigated preparations, direct effects against bacteria and fungi were described previously. In our own trials the plant extract and the bacterial preparation reduced the release and the survival of zoospores of the *in vitro* cultivable oomycete *Phytophthora infestans*. In an assay on leaf discs, released and encysted zoospores of *P. cubensis* could be found, but only few germ tubes were formed. The growth of mycelia of *P. infestans* was also inhibited by both gramicidin S and the plant extract.



---

Moreover, preliminary trials were performed to evaluate if induced resistance – besides a direct effect on the pathogen – might contribute to the overall protective effect of both preparations. Using DAB-staining, an increase of reactive oxygen species was observed after treatment of leaf discs with both *A. migulanus* culture supernatant and the plant extract. This very strong reaction did not occur after treating the leaf discs with sedimented bacterial cells or gramicidin S.

The investigation of the expression of plant stress related enzymes using quantitative real time PCR showed a strong up-regulation of peroxidase encoding gene. The PR-1 encoding gene was slightly up-regulated as compared to water treated controls.

Although the direct effect of the preparations was proven, an induction of resistance could not be fully excluded. Further investigations are required to completely elucidate this question.

During serial subcultivation of the bacterial culture in liquid medium (TSB), a dissociation into different phenotypes occurred. One strain, termed “*A. migulanus* white”, was isolated which showed similar colony morphology, number of spores, and amount of the metabolite (gramicidin S) as *A. migulanus* wild type. Another strain with atypical morphology was noticed. Its colony was translucent, it produced less cells, and it was unable to form spores, but produced the metabolite gramicidin S. Phylogenetic analyses of 16S rRNA-encoding genes collocated both strains with the *A. migulanus* type-strain (DSM 2895<sup>T</sup>). These results were supported by sequence similarity of 99.9 – 99.7% as calculated from a p-distance matrix.

For the use of *A. migulanus* in commercial trials a huge amount of culture broth is necessary. Previous investigations showed that it is difficult to cultivate the bacteria in a liquid fermenter (7L), where *A. migulanus* formed spores, but produced only very small amounts of gramicidin S. Own investigations showed that cultivation on solid medium (TSA) was possible without difficulties. The yield of gramicidin S was similar to the yield obtained after cultivation in 1L-Erlenmeyer flasks (200ml TSB). However, on solid media the biosurfactant was either not produced or it diffused into the medium. Therefore, the efficacy of bacterial preparations from solid media is based uniquely on the metabolite produced.

In Germany the extract of *M. cordata* is sold as additive for animal feed (Phytobiotics GmbH), and little is known about the spectrum of activity against phytopathogens. In spite of the very good efficacy against downy mildews, no efficacy against the ascomycete fungus *Podosphaera xanthii*, the causative agent of powdery mildew of cucumber, was observed. In concentrations

---

above 1000µg/ml the plant extract showed activity against seed-borne pathogens of carrot (*Alternaria dauci* and *A. radicina*) *in vivo*. Under *in vitro* conditions on solid medium the growth of mycelia of *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, and *Phytophthora infestans* was inhibited at concentrations of 20-50µg/ml, giving first indications on the spectrum of activity of *M. cordata* extract and its possible use in plant protection. However, it is self-evident that these results have to be further corroborated in trials on plants under both controlled and commercial conditions.

---

## 7 Literaturverzeichnis

---

- ABIZOV, E.A., TOLKACHEV, O.N., KOPYLOVA, I.E., LUFEROV, A.N. (2002): Distribution of the sum of sanguinarine and chelerythrin in the above-ground part of *Macleaya microcarpa*. Pharmaceutical Chemistry Journal 37 (8), 18 - 19
- AFONIN, S., DÜRR, U.H.N., WADHWANI, P., SALGADO, J., ULRICH, A.S. (2008): Solid state NMR structure analysis of the antimicrobial peptide Gramicidin S in lipid membranes: concentration-dependent realignment and self assembly as a  $\beta$ -barrel. Topics of Current Chemistry, 273 139 -154
- AGRIOS, G.N. (2008): Plant pathology. 5th ed., 3rd print., Elsevier Academic Press, Amsterdam
- ALEXANDER, D., GOODMAN, R.M., GUT-RELLA, M., GLASCOCK, C., WEYMANN, K., FRIEDRICH, L., MADDOX, D., AHL-GOY, P., LUNTZ, T., RYALS, J. (1993): Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. Proceedings of National Academy of Sciences of USA 90, 7327 - 7331
- ALVAREZ, M.E., PENNELL, R.I., MELJER, P.-J., ISHIKAWA, A., DIXON, R.A., LAMB, C. (1998): Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell 92, 773 - 784
- ASHRAFUZZAMAN, M. ANDERSEN, O.S., McELHANEY, R.N. (2008): The antimicrobial peptide Gramicidin S permeabilizes phospholipid bilayer membranes without forming discrete ion channels. Biochimica et Biophysica Acta 1778 (12), 2814 - 2822
- AZEVO, R., RODRIGUEZ, E. (2012): Phytotoxicity of mercury in plants: A review. Journal of Botany 2012, doi:10.1155/2012/848614
- BAAYEN, R.P. & ARIJS H. (2011): Evaluation and review of the European Union's plant health regime. EPPO Bulletin 41, 57 - 58
- BALE, J.S., van LENTEREN, J.C., BIGLER, F. (2008): Biological control and sustainable food production. Philosophical Transactions of the Royal Society B; Biological Sciences 363, 761 - 776
- BERDITSCH, M., AFONIN, S., ULLRICH, A.S. (2007): The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic Gramicidin S is correlated with phenotype variation. Applied and Environmental Microbiology Vol. 73 (20) 6620 - 6628

---

BERDITSCH, A., TURKSON, J., AFONIN, S., WEBER, C., FATOUHI ARDAKINI, M., GERTHSEN, D., ULRICH, A.S (2011): Production of antibiotic Gramicidin S in *Aneurinibacillus migulanus*: Phenotypic specificity and intercellular peptide accumulation in granules. BIOspektrum, Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2011, Karlsruhe 3. – 6. April 2011

BLAESER, P. (1999): Isolierung und Charakterisierung von Pflanzeninhaltsstoffen mit fungizider Wirkung. Dissertation, Universität Bonn.

BLAESER, P., STEINER, U., DEHNE, H.-W. (2002): Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL 97

BLECHERT, S., BRODSCHELM, W., HÖLDER, S., KAMMERER, L., KUTCHAN, T.M., MUELLER, M.J., XIA, Z-Q., ZENK, M.H. (1995): The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences 92, 4099 - 4105

BONASERA, J.M., KIM, J.F., BEER, S.V. (2006): PR-genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. BioMed Central Plant Biology 6 (23), doi:10.1186/1471-2229-6-23

BÖRNER, H., SCHLÜTER, K., AUMANN, J. (2009): Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 8., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, London, New York

BRADLEY, D.J., KJELLBOM, P., LAMB, C.J. (1992): Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a prolin-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. Cell 70, 21 - 30

BRITTON, N., BROWN, A. (1913): Illustrated flora of northern United States and Canada. Vol. II Amaranthaceae to Loganiaceae, Second edition - revised and enlarged, Dover Publications Inc., New York

CHASE, A.R., SIMONE, G.W. (1985): Phytotoxicity on foliage ornamentals caused by bactericides and fungicides. Plant Pathology Fact Sheet (Copied 2001)

CHEN, Y-Z., LIU, G-Z., SHEN, Y., CHEN, B. ZENG, J-G. (2009): Analysis of alkaloids in *Macleaya cordata* (Willd.) R Br. using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1216, 2104 - 2110

CHITTA, R.K., GROSS, M.L. (2004): Electrospray ionization-mass spectrometry and tandem mass spectrometry reveal self-association and metal-ion binding of hydrophobic peptides: A study of the Gramicidin dimer. Biophysical Journal 86, 473 - 479

---

COHEN, Y. (1977): Growth and differentiation of sporangia and sporangiophores of *Pseudoperonospora cubensis* on cucumber cotyledons under various combinations of light and temperature. *Physiological Plant Pathology* 10 (2), 93 – 96

COHEN, Y. (1981). Downy mildew of cucurbits. In *The downy mildews*, Ed. Spencer D.M., Academic, London, 341 – 354

COLUCCI, S.J., HOLMES, G.J. (2010): Downy mildews of cucurbits. *The Plant Health Instructor*, DOI: 10.1094/PHI-I-2010-0825-01

DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANONÁ, E., VAN MONTAGU, M., INZÈ, D., VAN BREUSEGEM, F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress response. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779 - 795

DESAI, J.D., BANAT, I.M. (1997): Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (1), 47 - 64

DICK, M.W. (2001). *Straminipilous fungi: Systematics of the peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

DOBRITSA, A.P, DOBRITSA, S.V., TANYASHIN, V.I. (1978): Isolation and characterization of plasmid from the *Bacillus brevis* var. G.-B. cells. *Molecular and general Genetics* 164, 195 - 204

DOKE, N. (1983): Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* to the hyphal wall components. *Physiological Plant Pathology* 23, 345 - 357

DUDLER, R., HERTIG, C., REBMANN, G., BULL, J., MAUCH, F. (1991): A pathogen induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione-S-transferases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4, 14 – 18

DURNER, J., KLESSIG, D.F. (1995): Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 11312 - 11316

DZINK J., SOCRANSKY, S.S. (1985): Comparative in vitro activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27 (4), 663 - 665

EDWARDS, S.G. (1993): Biological control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus brevis* on protected Chinese cabbage. PhD Thesis, University of Aberdeen, Scotland

---

EDWARDS, S.G., SEDDON, B. (1992): *Bacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected Chinese cabbage. Recent advantages in *Botrytis* research, Ed.: Verheoff, K., Malathrakis, N.E., Williamson, B., Pudoc Scientific, Wageningen, 267 - 271

EDWARDS, S.G., MCKAY T., SEDDON, B. (1994): Interaction of *Bacillus* species with phytopathogenic fungi – methods of analysis and manipulation for biological control purposes. In: Ecology of Plant Pathogens, 101 – 118, Eds. Blakemann, J.P. & Williams B., CAB International, Wallingford UK

EHLERS, R.-U. (2006): Einsatz der Biotechnologie im biologischen Pflanzenschutz. Schriftreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft e.V., Bd. 8, 17 – 31, Eugen Ulmer KG, Stuttgart

ELSTNER, E.F. (1982): Oxygen activation and oxygen toxicity. Annual Review of Plant Physiology 33, 73 - 96

ELSTNER, E.F., OßWALD, W., SCHNEIDER, I. (1996): Phytopathologie. Allgemeine und biochemische Grundlagen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

ELSTNER, E.F., WAGNER, G.A. & SCHUTZ, W. (1988): Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology 7, 159-187.

FALKHOF, A.-G., DEHNE, H.-W., SCHÖNBECK, F. (1988): Dependence of the effectiveness of induced resistance on environmental conditions. Journal of Phytopathology, 123 (4), 311 - 321

FAUTZ, M. (2006): Wirksamkeit und Wirkprinzipien eines Salbeiextraktes gegen den Erreger des Falschen Mehltaus an Gurken (*Pseudoperonospora cubensis*). Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt

FERRÉ J., Real, M.D., VAN RIE, J., JANSSENS, S., PEFEROEN, M. (1991): Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 88, 5119-5123

FORSTER, R. (2008): Zulassungssituation für kupferhaltige Pflanzenschutzmittel für die Saison 2008. In: Fachgespräch „Bedeutung von Kupfer für den Pflanzenschutz, insbesondere für den Ökologischen Landbau – Reduktions- und Ersatzstrategien“, Berlin-Dahlem, 29.1.2008, JKI Berichte 142

FRAYMOUTH, J. (1956): Haustoria of *Peronosporales*. Transactions of the British Mycological Society 39, 79 - 107

FRIEBEL, T.E., DEMAINE, A.L. (1977): Oxygen-dependent inactivation of Gramicidin S synthetase in *Bacillus brevis*. Journal of Bacteriology 130 (3), 1010 - 1016

---

FRITSCH, E., UNDORF-SPAHN, K., KIENZLE, J., ZEBITZ, C., HUBER, J. (2005): Codling moth granulovirus: first indication of variations in the susceptibility of local codling moth populations. *Journal für Kulturpflanzen* 57, 29-34

FRITZ, I.G. (1996): Physiologische Wirkung von Resistenzinduktoren: Primäre und sekundäre Reaktionen im Wirt-Pathogen-System Gurke / Echter Gurkenmehltau. Dissertation, Technische Universität Darmstadt

GALLETTI, R., DeLORENZO, G., FERRARI, S. (2009): Host-derived signals activate plant innate immunity. *Plant Signaling & Behavior* 4 (1), 33 – 34

GARCÍA, V.P., VALDÉS, F., MARTIN, R., LUIS, J.C., AFONSO, A.M., AYALA, J.H. (2005): Biosynthesis of antitumoral and bactericidal sanguinarin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. DOI 10.1155/JBB/2006/63518

GAUSE, G.F. (1946): Gramicidin S, review of recent work. *The Lancet*, 46 - 47

GAUSE, G.F., BRAZHNIKOVA, M.G. (1944): Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature* 3918, 703

GAY J.L., MARTIN M., BALL E. (1985). The impermeability of powdery mildew conidia and their germination in arid environments. *Plant Pathology* 34, 353 - 362

GISI, U., SIEROTZKI, H. (2008): Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology* 12, 157 - 167

GISI, U, ZENTMYER, G.A. (1980): Mechanism of zoospore release in *Phytophthora* and *Pythium*. *Experimental Mycology* 4 (4), 362 – 377

GISI, U, HEMMES, D.E., ZENTMYER, G.A. (1979): Origin and significance of the discharge vesicle in *Phytophthora*. *Experimental Mycology*, 3 (4), 321 - 339

GOTO, K., FUJITA, R., KATO, Y., ASAHARA, M., YOKATA, A. (2004): Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (=NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 419 - 427

GRAYER, R.J., KOKUBUN, T. (2001): Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins or other antifungal compounds from higher plants. *Photochemistry* 56, 253 - 263

GREY-WILSON, C. (1993): Poppies. The poppy family in the wild and in cultivation. Chrysalis Book Group, London

---

GUEVARA-MORATO, M.Á., GARCÍA De LACOPA, M., GARCÍA-LUQUE, I., SERRA, M.T. (2010): Characterization of pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L<sup>3</sup> plants with dual RNase and DNase activities. *Journal of Experimental Botany* 61 (12), 3259 - 3271

GUINDON, S. & GASCUEL, O. (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52 (5), 696 - 704

HALLMANN, J., QUAD-HALLMANN, A., von TIEDEMANN, A. (2007): *Phytomedizin. Grundwissen Bachelor*. 1. Auflage, UTB GmbH, Stuttgart

HAMER, E.C., MOORE, C.B., DENNING, D.W. (2006): Comparison of two fluorescent whiteners, Calcofluor and Blankophor, for the detection of fungal elements in clinical specimens in the diagnostic laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* 12 (2), 181 - 184

HARDHAM, A.R. (2005): *Phytophthora cinnamoni*. *Molecular Plant Pathology*, 6 (6), 589 - 604

HARDHAM, A.R. (2009): The asexual life cycle. In: *Oomycete genetics and genomics: Diversity, interactions and research tools*. Ed.: Lamour, K. & Kamoun, S., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey

HARKRADER, R.J., REINHART, P.C., ROGERS, J.A. JONES, R.R., WYLIE, R.E., LOWE, B.K., McEVOY, R.M. (1990): The history, chemistry, and pharmacokinetics of sanguinaria extract. *Journal of Canadian Dental Association* 56, 7 - 12

HARTMANN, M. (2012): *Mikrobiologische Untersuchungen an der Gramicidin S Synthetase in A. migulanus und der Tat-Translokase in B. subtilis*. Dissertation, Universität Karlsruhe

HARTMANN, M., BERDITSCH, M., HAWECKER, J., ARDAKANI, M.F., GERTHSEN, D., ULRICH, A.S. (2010): Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides Gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (8), 3132 - 3142

HASEGAWA, M., KISHINO, H., YANO, T.-A. (1985): Dating of the human–ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22 (2), 160 - 174

HASEGAWA, M., MITSUHARA, I., SEO, S., IMAI, T., KOGA, J., OKADA, K., YAMANE, H., OHASHI, Y. (2010): Phytoalexin accumulation in the interaction between rice and the blast fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23 (8), 1000 - 1011

HAUG, G., SCHUHMANN, G., FISCHBECK, G. (1990): *Pflanzenproduktion im Wandel, Neue Aspekte in den Agrarwissenschaften*. Hrsg. HAUG, G., 1. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim



---

HEIL, M., BOSTOCK, R.M. (2002): Induced Systemic Resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defense. *Annals of Botany*, 89, 503 - 512

HERGER, G. (1991): Die Wirkung von Auszügen aus dem Sachalin-Staudenknöterich, *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, gegen Pilzkrankheiten, insbesondere Echte Mehltaupilze. Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt

HEYNDRICKX, M., LEBBE, L., VANCANNEYT, M., KERSTENS, K., De VOS, P., LOGAN, N.A., FORSYNTH, G., NAZALI, S., ALL, N., BERKELEY, R.C.W. (1997): A polyphasic reassessment of the genus *Aneurinibacillus*, reclassification of *Bacillus thermoaerophilus* (Meier-Staufer et al. 1996) as *Aneurinibacillus thermoeaerophilus* comb. nov., and emended descriptions of *A. aneurinilyticus* corrig., *A. migulanus*, and *A. thermoaerophilus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* Vol. 47 (3), 808 - 817

HOYER, M.-K. (2008): Iterative NPRS-Systeme, Charakterisierung der Gramicidin S-Thioesterase und der Analyse der Thiocoralin-3-Hydroxychinaldinsäure-Biosynthese. Dissertation, Philipps-Universität Marburg

HUXLEY, A.J., GRIFFITHS, M. (1992): Dictionary of Gardening Vol. 3, Royal Horticultural Society (Great Britain). Macmillan Press, London

JACKSON, S.L., HARDHAM, A.R. (1996): A transient rise in cytoplasmatic free calcium is required for the induction of cytokinesis in zoosporangia of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Cell Biology* 69, 180 - 188

JAHN, M., KOCH, E., BLUM, H., NEGA, E., WILBOIS, K.-P. (2007): Leitfaden Saatgutgesundheit im Ökologischen Landbau, Forschungsinstitut für biologischen Landbau e. V., Top Kopie GmbH, Frankfurt Main, (<http://orgprints.org/11675/>)

JÄNSCH, S., RÖMBKE, J. (2009): Einsatz von Kupfer als Pflanzenschutzmittel-Wirkstoff: Ökologische Auswirkungen der Akkumulation von Kupfer im Boden, Forschungsbericht 36003040. Hrsg. Umweltbundesamt, <http://www.umweltbundesamt.de>

JELOKHANI-NIARAKI, M., HODGES, R.S., MEISSNER, J.E., HASSENSTEIN, U.E., WHEATON, L. (2008): Interaction of Gramicidin S and its aromatic amino-acid analog with phospholipid membranes. *Biophysical Journal* 95, 3306 - 3321

KAMOUN, S., HUITEMA, E., VLEESHOUVERS, V.G.A.A. (1999): Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends in Plant Science* 4(5), 196 - 200

KILIAN, M., STEINER, U., KREBS, B., JUNGE, H., SCHMIEDEKNECHT, G., HAIN, R. (2000): FZB24<sup>®</sup> *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutznachrichten*, 1, 72 - 93

---

KONDEJEWSKI, L.H., FARMER, S.W., WISHART, D.S., HANCOCK, R.E.W., HODGES, R.S. (1996): Gramicidin S is active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 47, 460 - 466

KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS S., MARKELLOU E. (2008). Antifungal activity of ethanolic *Glycyrrhiza glabra* L. extracts against infection of tomato plants by *Phytophthora infestans*. Summaries of papers and posters presented at the 14th Hellenic Phytopathological Congress, Nafplio, Greece, October 7 – 10 2008

KOSINA, P., GREGOROVA, J., GRUZ, J., VACEK, J., KOLAR, M., VOGEL, M., ROOS, W., NAUMANN, K., SIMANEK, V., ULRICHOVA, J. (2010): Phytomedicinal and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb. *Fitoterapia* 81, 1006 - 1012

KÜHLHEIM, H. (1987): Untersuchungen zur Wirksamkeit von Pflanzenstärkungsmitteln gegen Krankheiten und Schädlinge an einigen landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Dissertation, Universität Hohenheim

KÜHNE, S., BURTH, U., MARX, P. (2006): Biologischer Pflanzenschutz im Freiland, Pflanzenschutz im Ökolandbau, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

KUMAR, S., RZHETSKY, A. (1996): Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. *Journal of Molecular Evolution* 42, 183–193

KWAK, J.M., NGUYEN, V., SCHROEDER, J.I. (2006): The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiology* 141, 323 - 329

LAATSCH, H.: Mikroorganismen als biologische Quelle neuer Wirkstoffe. In: Pharmazeutische Biotechnologie, Ed. Kayser, O., Müller, R.H., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2000, 13 - 43

LATTEN, J. (1994): Biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze mit Hilfe von Pflanzenextrakten. Dissertation, Universität Gießen

LAZARDIS, I. (1981): Spore characteristics of wild-type and Gramicidin S-mutants of *Bacillus brevis* Nagano. PhD Thesis, University of Aberdeen

LEBEDA, A., COHEN, Y. (2011): Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) - biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. *European Journal of Plant Pathology* 129, 157 - 192

LEBEDA, A., SWINN, F.J. (1994): The downy mildews – an overview of recent research progress. *Journal of Plant Disease and Plant Protection* 101, 225 - 254

LEBEDA, A., WIDRLECHNER, M.P. (2003): A set of *Cucurbitaceae* taxa for differentiation of *P. cubensis* pathotypes. *Journal of Plant Diseases and Protection* 110, 337 – 349

- 
- LENFELD, J., KROUTIL, M., MARSÁLEK, E., SLAVÍK, J., PREININGER, V. (1981): Antiinflammatory activity of quarternary benzophenathridine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta medica, Journal of Medicinal Plant Research* 43, 161 – 165
- LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R., LAMB, C. (1994): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79, 583 - 593
- LIEBERHERR, D., WAGNER, U., DUBUIS, P.-H., MÉTRAUX, J.-P., MAUCH, F. (2003): The rapid induction of glutathion S-transferase (GST) AtGSTF2 and AtGSTF6 by avirulent *Pseudomonas syringae* is the result of combined salicylic acid and ethylene signaling. *Plant Cell Physiology* 44 (7), 750 - 757
- LINDENTHAL, M., STEINER, U., DEHNE, H.-W., OERKE, E.-C. (2005): Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology* 95 (3), 233 - 240
- LIU, H., WANG, J., ZHAO, J., LU, S., WANG, J., JIANG, W., MA, Z., ZHOU, L. (2009): Isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* active against plant microbial pathogens. *Natural Product Communications Vol. 4* (11), 1557 - 1560
- LOCHOW, J. von, SCHUSTER, W. (1961): Anlage und Auswertung von Feldversuchen. 1. Auflage. DLG-Verlag, Frankfurt/ Main
- MACKRAJ, I., GOVENDER, T., GATHIRAM, P. (2008): Sanguinarine. *Cardiovascular Therapeutics* 26, 75 - 83
- MALIKOVA, J., ZDARILOVA, A., HLOBILKOVA, A. (2006): Sanguinarine and chelerythrine on cell cycle and apoptosis. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký Olomouc Czech Republic* 150 (1), 5 - 12
- MAKINO, T. (1948): An illustrated flora of Japan, with the cultivated and naturalized plants. Verlag Hokuryukan Tokyo (in Japanese)
- MARAHIEL, M.A., DANDERS, W., KRAUSE, M., KLEINKAUF, H. (1979): Biological role of Gramicidin S in spore functions. Studies on gramicidin S-negative mutants of *Bacillus brevis* ATCC 9999. *European Journal of Biochemistry* 99, 49 - 55
- MARRS, K.A. (1996): The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 127 – 158.
- MARX, P., GÄRBER, U. (2009): Falscher Mehltau an Gurke - Regulierung durch gezielte Klimaführung und Sortenwahl im Unterglasanbau, Beiträge zur 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau: Werte – Wege – Wirkungen: Biolandbau im Spannungsfeld zwischen Ernährungssicherung, Markt und Klimawandel, Band 1, Zürich, 11.-13. Februar 2009, 352f

---

MARX P., GÄRBER, U., GEBELEIN, D. (2010): Falscher Mehltau an Gurke im ökologischen Gemüseanbau unter Glas – Regulierung durch gezielte Klimasteuerung. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, Julius-Kühn-Archiv 428, 452.

MC NALLY D.J., WURMS K.V., LABBÉ C., BÉLANGER R.R. (2003). Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63 (3), 293 - 303

MITTLER, R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7 (9), 405 - 410

MOSER, M. (2005): Einsatz von phytogenen Futterzusätzen am Beispiel eines Wurzelpräparates von *Sanguinaria canadensis* L. und dessen Einfluss auf den Proteinansatz und auf die Verwertung der Nahrungsenergie bei wachsenden Broilern. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

MÜLLER, S. (2002): Resistenzinduktion und Pathogenabwehr durch *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt und Physcion: Signalkette im Vergleich zu systemischen Induktoren und Beziehungen zur Hypersensitiven Reaktion. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

MÜLLER, K. O., BÖRGER, H. (1940): Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*: Resistenz der Kartoffel. *Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 23, 189 - 231

NANDI, S., SEDDON, B. (1978): Evidence for gramicidin S functioning as a bacterial hormone specifically regulating spore outgrowth in *Bacillus brevis* strain Nagano. *Biochemical Society Transactions* 6, 409 - 411

NEWMANN, S.E., ROLL, M.J., HARKRADER, R.J. (1999): A naturally occurring compound for controlling powdery mildew of greenhouse roses. *HortScience* 34 (4), 686 - 689

NIDERMAN, T., GENETET, I., BRUYÈRE, T., GEES, R., STINTZI, A., LEGRAND, M., FRITIG, B., MÖSINGER, E. (1995): Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108, 17 - 27

NÜRNBERGER, T., BRUNNER, F., KEMMERLING, B., PIATER, L. (2004): Innate immune system in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198, 249 - 266

OUYANG, L., SU, X., HE, D., CHEN, Y., MA, M., XIE, Q., YAO, S. (2010): A study on separation and extraction of four main alkaloids in *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. with strip dispersion hybrid liquid membrane. *Journal of Separation Science* 33, 2026 - 2034

---

PALTI, J., COHEN, Y. (1980): Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*): The fungus and its hosts, distribution, epidemiology and control. *Phytoparasitica* 8, 109 – 147

PAYNE, G., AHL, P., MOYER, M., HARPER, A., BECK, J., MEINS, F.Jr., RYALS, J. (1990): Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 87, 98 - 102

PENG, M., KUC, J. (1992): Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaves. *Phytopathology* 82, 696 - 699

PSOTOVA, J., VECERA, R., ZDARILOVA, A., ANZENBACHEROVA, E., KOSINA, P., SVOBODOVA, A., HRBAC, J., JIROVSKY, D., STIBOROVA, M., LICHNOVSKY, V., VICAR, J., SIMANEK, V., ULRICHOVA, J. (2006): Safety assessment of sanguiritrin, alkaloid fraction of *Macleaya cordata*, in rats. *Veterinari Medicina* 51, 145 - 155

PIRET, J.M., DEMAINE, A.L. (1982): Germination initiation and outgrowth of spores of *Bacillus brevis* strain Nagano and its gramicidin S-negative mutant. *Archives of Microbiology* 133, 38 – 43

RASSMUSSEN, J.B., SMITH, J.A., WILLIAMS, S., BURKHART, W., WARD, E., SOMERVILLE, S.C., RYALS, J.A., HAMMERSCHMIDT, R. (1995): cDNA cloning and systemic expression with systemic acquired resistance to disease in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46, 389 - 400

ROHDE, S. (2003): Evaluierung gentechnischer Ansätze zur Reduktion des Befalls von Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.) durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, Dissertation, Leibniz Universität Hannover

ROSENBERG, E., BROWN, D.R., DEMAINE, A.L. (1985): The influence of gramicidin S on hydrophobicity of germinating *Bacillus brevis* spores. *Archives of Microbiology* 142, 51 – 54

RUDEN, S., HILPERT, K., BERDITSCH, M., WADHWANI, P., ULRICH, A.S. (2009): Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(8), 3538 - 3540

RUNGE, F., THINES, M. (2009): A potential perennial host for *Pseudoperonospora cubensis* in temperate regions. *European Journal of Plant Pathology* 123, 483 – 486

RUNGE, F., THINES, M. (2010): Host matrix has major impact on the morphology of *Pseudoperonospora cubensis*. *European Journal of Plant Pathology* 129, 147 -156

RYALS, J., UKNES, S., WARD, E. (1994): Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 104 (4), 1109 - 1112

---

SALGADO, J., GRAGE, S.L., KONDEJEWSKI, L.H., HODGES, R.S., McELHANEY, R.N., ULRICH, A.S. (2001): Membrane-bound structure and alignment of the antimicrobial peptide gramicidin S derived from angular and distance constraints by solid state <sup>19</sup>F-NMR. *Journal of Biomolecular NMR* 21, 191 - 208

SASSER, M. (2001): Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Labs Incorporated Technical Note 101, 1 - 6

SAVORY, E.A., GRANKE, L.L., QUESADA-OCAMPO, L.M., VARBANOVA, M., HAUSBECK, M.K., DAY, B. (2011): The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Molecular and Plant Pathology* 12 (3), 217 – 226

SCHERF, A. (2012): Licorice, cucumber, downy mildew: tracing the secret. Interactions between the plant extract, the host and the pathogen. Dissertation, Technische Universität Darmstadt

SCHERF, A., SCHUSTER, C., MARX, P., GÄRBER, U., KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS, S.<sup>†</sup>, and SCHMITT, A. (2010): Control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of greenhouse grown cucumbers with alternative biological agents. *Communications in Agriculture and Applied Biological Sciences*, Ghent University 75 (4), 541-554

SCHMIDT, H.A., STRIMMER, K., VINGRON, M., von HAESELER, A. (2002): TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analyses using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18 (3), 502 – 504

SCHMITT, A., SEDDON, B. (2005): Biocontrol of plant pathogens with microbial BCAs and plant extracts – advantages and disadvantages of single and combined use. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV Proceedings of the 14th International Reinhardtbrunn Symposium*, 205 – 225, Eds. Dehne H.-W. et al, BCPC, Alton, Hampshire UK

SCHNEIDER-MÜLLER, S. (1991): Physiologische Veränderungen bei Pflanzen während der Ausbildung der Induzierten Systemischen Resistenz. Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt

SCHMUTTERER, H. (1990): Properties and potential of natural pesticides from Neem Tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology* 35, 271-297

SCHMUTTERER H. & HUBER J. (2005). *Natürliche Schädlingsbekämpfungsmittel*. Eugen Ulmer Verlag Stuttgart

SCHÖBER-BUTIN, B. (2001): Die Kraut- und Braunfäule der Kartoffel und ihr Erreger *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 384

SCHÖNBECK, F. (1979): *Pflanzenkrankheiten*. B. G. Teubner, Stuttgart

---

SCHÖNBECK, F., STEINER, U., KRASKA, T. (1993): Induzierte Resistenz: Kriterien, Mechanismen, Anwendung und Bewertung. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 100, 541 – 557

SCHUSTER, C. (2008): Untersuchung der Wirksamkeit eines Extraktes aus *Glycyrrhiza glabra* gegen luft-, boden-, und samenbürtige Phytopathogene. Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt

SCHUSTER, C., GÄRBER, U., LEINHOS, G., SCHMITT, A. (2010): Wirkung von *Aneurinibacillus migulanus* gegen phytopathogene Oomyceten. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, Julius-Kühn-Archiv 428, 447

SCHUSTER, C., KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS, S., SCHMITT, A. (2010): *Glycyrrhiza glabra* extract protects plants against important phytopathogenic fungi. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University 75 (4), 531 – 540

SEDDON, B., NANDI, S. (1978): Biochemical aspects of germination and outgrowth of *Bacillus brevis* Nagano and control by gramicidin S. Biochemical Society Transactions 6, 412 - 413

SEDDON, B., EDWARDS, S., MARKRILLOU, E., MALATHRAKIS, N.E. (1997): Bacterial antagonist – fungal pathogen interactions on plant aerial surface. In: Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems. The 36th Symposium of the British Society, 5 – 25, Eds.: Gange, A.C. & Brown, V.K., Blackwell Science, London UK

SEDDON, B., MCHUGH, R.C., SCHMITT, A., KOCH, E., GRAHAM, N., WILSON, M., EIBEL, P., STEPHAN, D., DERTZAKIS, D., LASARAKI, I., TSOMLEXOGLU, E., CARVALHO, S.M., MARSHALL, D., DAGGAS, T., WHITE, D., BOUQUELLAH, N.A., WOODWARD, S., PALOUKIDOU, E., ALLAN, E.J. (2008): Disease control with *Bacillus brevis*: update and future prospects. In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds V Proceedings of the 15th International Reinhardtsbrunn Symposium, 253 – 262, Eds.: Dehne H.-W. et al., BCPC, Alton, Hampshire UK

SHIDA, O., TAKAGI, H., KADOWAKI, K., YANO, H., ABE, M., UDAKA, S., KOMAGATA, K. (1994): *Bacillus aneurinilyticus* sp. nov., nom. rev. International Journal of Systematic Bacteriology 44 (1), 143 - 150

SHIDA, O., TAKAGI, H., KADOWAKI, K., KOMAGATA, K. (1996): Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. International Journal of Systemic Bacteriology 46 (4), 939 – 946

SITTE, P., WEILER, E.J., KADEREIT, J.W., BRESINSKY, A., KÖRNER, C. (2002): Strasburger, Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 35. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

---

STACKEBRANDT, E., GOEBEL, B.M. (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in biology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (4), 846 - 849

STANGHELLINI, M.E., MILLER, R.M. (1997): Biosurfactants, Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Disease* 81 (1), 5 - 12

STEPHAN, D., SCHMITT, A., MARTINS CARVALLHO, S., SEDDON, B., KOCH, E. (2005): Evaluation of biocontrol preparations and plant extracts for control of *Phytophthora infestans* on potato leaves. *European Journal of Plant Pathology* 112, 235 - 246

STIPEROVA, M., VOSTALOVA, J., ZDARILOVA, A., ULRICHOVA, J., HUDECEK, J., TSCHIRNA, K., SIMANEK, V. (2008): *Macleaya cordata* extract and Sangrovit® genotoxicity. Assesment in vivo. *Biomedicinal papers of the Medicinal Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 152 (1), 35 - 39

TAKAGI, H., SHIDA, O., KADOWAKI, K., KOMAGATA, K., UDAKA, S. (1993): Characterization of *Bacillus brevis* with descriptions of *Bacillus migulanus* sp. nov., *Bacillus choshinensis* sp. nov., *Bacillus parabrevis* sp. nov., and *Bacillus galactophilus* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* Vol. 43 (2), 221 – 231

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., and KUMAR, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10), 2731 - 2739

THINES, M., KAMOUN, S. (2010): Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 427 - 433

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. (1994): CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 (22), 4673–4680

THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEI, Y., COLLINGE, D.B. (1997): Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11 (6), 1187 - 1194

THURLOW, L.R. & GILLOCK, E.T. (2005): Characterization of two environmental bacterial isolates by 16S rRNA sequence analysis, fatty acid methyl ester analysis, and scanning electron microscopy. *Transactions of the Kansas Academy of Science* 108 (1/2), 22 - 31

TSCHIRNER, K. (2004): Untersuchungen zur Wirksamkeit und zum Nachweis des pflanzlichen Alkaloids Sanguinarin beim Schwein. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



- 
- URBAN, J., LEBEDA, A. (2006): Fungicide resistance in cucurbit downy mildew – methodological, biological and population aspects. *Annals of Applied Biology* 149, 63 - 75
- Van ASSCHE, F., CLIJSTERS, H. (1990): Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* 13, 195 - 206
- Van der WOUDE, M.W. & BÄUMLER, A.J. (2004): Phase and antigenic variation in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 17 (3), 581 - 611
- Van LENTEREN, J.C. (2005): Early entomology and discovery of insect parasitoids. *Biological Control* 32, 2 – 7
- Van LOON, L.C. (1997): Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103, 753 - 765
- Van LOON, L.C., PIERPOINT, W.S., BOLLER, T., CONEJERO, V. (1994): Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12, 245 - 264
- Van LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J. (1998): Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36, 453 - 483
- VITALI, A., BOTTA, B., DELLE MONACHE, G., ZAPPITELLI, S., RICCIARDI, P., MELINO, S., PETRUZZELLI, R., GIARDINA, B. (1998): Purification and partial characterization of peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation. *Biochemical Journal* 331, 513 - 519
- VOGEL, M., LAWSON, M., SIPPL, W., CONRAD, U., ROOS, W. (2010): Structure and mechanism of sanguinarine reductase, an enzyme of alkaloid detoxification. *Journal of Biological Chemistry* 285 (24), 18397 -18406
- WAGNER, U., EDWARDS, R., DIXON, D.P., MAUCH, F. (2002): Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* 49, 515 - 532
- WALKER, R., POWELL, A.A., SEDDON, B. (1998): *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French peas with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *Journal of Applied Microbiology* 84, 791 - 801
- WALKER, C.A., Van WEST, P. (2007): Zoospore development in oomycetes. *Fungal Biology Reviews* 21, 10 - 18
- WALLACE, B.A. (1990): Gramicidin channels and pores. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 19, 127 - 157

---

WALSH P.S., METZGER, D.A., HIGUCHI, R. (1991): Chelex 100 a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506 - 513

WALTER, H., NAU, K.-L., WELKER, O. (1977): Pflanzenspezifische Anforderungen an Spritzflüssigkeit und Applikation. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Sonderheft* 8, 317 - 328

WALTEROVÁ, D., ULRICHOVÁ J., VÁLKA, I., VIČAR, J., VAVREČKOVÁ, C., TÁBORSKA, E., HARKRADER R.J., MEYER, D.L., ČERNA, H., ŠIMÁNEK, V. (1995): Benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine: Biological activities and dental care applications. *Acta Universitatis Palackianae Olumcensis Facultatis Medicinae* 139, 7-16

WARD, E.R., PAYNE, G.P., MOYER M.B., WILLIAMS, S.C., DINCHER, S.S, SHARKEY, K.C., BECK, J.J., TAYLOR, H.T., AHL-GOY, P., MEINS, F.Jr., RYALS, J.A. (1991a) Differential regulation of  $\beta$ -1,3-glucanases messenger RNAs in response to pathogen infection. *Plant Physiology* 96, 390 - 397

WARD, E.R., UKNES, S.J., WILLIAMS, S.C., DINCHER, S.S., WIEDERHOLD, D.L., ALEXANDER, D.C., AHL-GOY, P., MÉTRAUX, J.-P., RYALS, J.A. (1991b): Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 3, 1085 - 1094

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D. A., LANE, D.J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173 (2), 697 - 703

WEISS, B., BAUMERT, A., VOGEL, M., ROOS, W. (2006): Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthrine detoxification. *Plant, Cell and Environment* 29, 291 - 302

WILBOIS, K-P., KAUER, R., FADER, B., KIENZLE, J., HAUG, P., FRITZSCHE-MARTIN, A., DRESCHER, N., REINERS, E., RÖHRING, P. (2009): Kupfer als Pflanzenschutzmittel unter besonderer Berücksichtigung des Ökologischen Landbaus. *Journal für Kulturpflanzen* 61 (4), 140 – 152

WÖLFLE, S. (2010): Charakterisierung von Phänotypen von *Aneurinibacillus migulanus*. Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt

WU, G., SHORTT, B.J., LAWRENCE, E., LEÓN, J., FITZSIMMONS, K.C., LEVINE, E.B., RASKIN, I., SHAH, D.M. (1997): Activation of host defense mechanisms by elevated production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic plants. *Plant Physiology* 115, 427 - 435

XIA X.-J., WANG, Y.-J., ZHOU, Y.-H., TAO, Y., MAO, W.-H., SHI, K., ASAMI, T., CHEN, Z., YU, J.-Q. (2009): Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiology* 150, 801 - 814

---

YOSHIDA, K., KAOTHEN, P., MATSUI, T., KAWAOKA, A., SHINMYO, A. (2002): Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 665 - 670

ZHARIKOVA, G.G., SAVCHENKO, G.V., MITRINOVA, T.N. (1964): Dissociation of *Bacillus brevis* var. G.B. *Mikrobiologija* 33, 605 – 609 (in Russisch)

ZHU, S.S., LIU, X.L., WANG, Y., WHU, X.H., LIU, P.F., LI, J.Q., YUAN, S.K., SI, N.G. (2007): Resistance of *Pseudoperonospora cubensis* to flumorph on cucumber in plastic houses. *Journal of Plant Pathology* 56, 967 - 975

### **Internetquellen**

[www.bergeys.org](http://www.bergeys.org)

LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.-H., WHITMAN, W.B. (2011): Revised road map to the phylum *Firmicutes*.

[www.bergeys.org/outlines/bergeys\\_vol\\_3\\_roadmap\\_outline.pdf](http://www.bergeys.org/outlines/bergeys_vol_3_roadmap_outline.pdf) (8.7.12)

[www.bmelv.de](http://www.bmelv.de)

<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Rechtsgrundlagen/P/InverkehrbringenPflanzenschutzVO.html> (am 23.11.11)

[www.eco-consult.net](http://www.eco-consult.net)

HOFMANN, U.: *Botrytis cinerea*, - eine Herausforderung für den Biologischen Weinbau  
[http://oekologischerlandbau.jki.bund.de/dokumente/upload/c5305\\_botrytis-herausforderung.pdf](http://oekologischerlandbau.jki.bund.de/dokumente/upload/c5305_botrytis-herausforderung.pdf) (am 28.3.2012)

[www.efloras.org](http://www.efloras.org)

[http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=1&taxon\\_id=200009159](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=200009159) (am 28.3.2012)

### **EG Nr. 473/2002**

VERORDNUNG (EG) Nr. 473/2002 DER KOMMISSION vom 15. März 2002, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:075:0021:0024:DE:PDF> (am 23.11.11)

### **EG Nr. 834/2007**

VERORDNUNG (EG) Nr. 834/2007 DES RATES vom 28. Juni 2007 über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:189:0001:0023:DE:PDF> (am 25.11.11)

---

EG Nr. 1107/2009

Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009; Amtsblatt der Europäischen Union

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:de:PDF>  
(am 23.11.11)

[www.midi-inc.com](http://www.midi-inc.com)

[http://www.midi-inc.com/pdf/MIS\\_Similarity\\_Index.pdf](http://www.midi-inc.com/pdf/MIS_Similarity_Index.pdf) (am 28.3.2012)

[www.midi-inc.com/pages/mis\\_libraries.html](http://www.midi-inc.com/pages/mis_libraries.html) (am 28.3.2012)

[www.oekolandbau.de](http://www.oekolandbau.de) A

[http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Oekolandbau/OekologischerLandbauDeutschland.html;jsessionid=11495CF5D2B982225016E349433FAA3D.2\\_cid237](http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Oekolandbau/OekologischerLandbauDeutschland.html;jsessionid=11495CF5D2B982225016E349433FAA3D.2_cid237)  
(am 23.11.11)

[www.oekolandbau.de](http://www.oekolandbau.de) B

<http://www.oekolandbau.de/erzeuger/pflanzenbau/pflanzenschutz/schadorganismen-im-gemuesebau/tomate/grauschimmel-geisterflecke-botrytis-cinerea/>

<http://www.oekolandbau.de/erzeuger/pflanzenbau/pflanzenschutz/schadorganismen-im-weinbau/pilzkrankheiten/grauschimmel-botrytis-cinerea/>  
(am 28.3.2012)

[www.phytobiotics.com](http://www.phytobiotics.com)

<http://www.phytobiotics.com/produkte/sangrovit.html> (am 25.11.11)

Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH, Wallufer Str. 10a, 65343 Eltville

[www.seqlab.de](http://www.seqlab.de)

<http://www.seqlab.de/>

Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Hannah-Vogt-Str. 1, 37085 Göttingen

STATUSBERICHT (2003)

Biologischer Pflanzenschutz 2003. Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Darmstadt.

[http://www.jki.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/\\_BI/pdf/statusbericht/Biologischer%20Pflanzenschutz%202003.pdf](http://www.jki.bund.de/fileadmin/dam_uploads/_BI/pdf/statusbericht/Biologischer%20Pflanzenschutz%202003.pdf) (am 25.11.11)

STOVE

<http://stove.jki.bund.de/> (am 25.11.11)

---

## 8 Danksagung

---

Zum Abschluss möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt vor allem:

Frau **Dr. A. Schmitt** für die Stellung des Themas, die Betreuung meiner Arbeit, für ihre Geduld, ihre Ratschläge und ihr Vertrauen in mein Schaffen.

Herrn **Prof. Dr. G. Thiel** für die Betreuung meiner Doktorarbeit auch außerhalb der TU-Darmstadt.

Frau **Prof. Dr. C. Ullrich-Eberius** für die Übernahme des Koreferats, für ihre Hilfestellung bei Versuchen, die Möglichkeit ihr wunderbares Mikroskop zu benutzen und die freimütige Herausgabe auch von ganz seltenen Chemikalien.

Herrn **Dr. J. Huber** und Herrn **Dr. habil. J. Jehle** für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien am Julius Kühn-Institut für Biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt.

Dem **BMELV** für die Finanzierung des Projektes im Zuge des Bundesprogramms Ökologischer Landbau. Der Firma **Phytobiotics GmbH** danke ich ebenfalls für die Finanzierung und die Bereitstellung des Pflanzenextraktes.

Herrn **Prof. Dr. B. Seddon** für seine Tätigkeit als externer Berater im Projekt.

**Andrea Scherf** für die gute Zusammenarbeit im gemeinsamen Projekt, ihre Unterstützung bei statistischen Problemen und ihre Gesprächsbereitschaft.

**Jan Wunderle** für seine Hilfe, die Diskussionsbereitschaft und die Versuche, mich immer wieder neu zu motivieren.

**Dr. Andreas Leclerque** für die Beantwortung meiner vielen Fragen, seinen Ehrgeiz, mir neue Methoden näher zu bringen, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im 2. Obergeschoss und so manchen Arbeitsmaterials sowie der kritischen Durchsicht der Arbeit.

**Diana Schneider** für ihre Einweisung in die quantitative Real-Time PCR und ihre Hilfe, als es mal schnell gehen musste.

Den Technischen Assistenten, ohne die die Versuche nicht zu schaffen gewesen wären: **Karin Bald** und **Mona von Eitzen-Ritter** für die Versuchsbetreuung und für die kritische Auseinandersetzung mit den Nekrosen; **Petra Zink** für ihre Hilfe mit den Bakterien; **Diana Nagel** und **Astrid von Galen** für die Pflanzenanzucht.

**Susanne Ganzer** und **Juliana Pelz** für ihre Freundschaft und ihre offenen Ohren über die vielen Jahre hinweg.

Bei **Marika Tews** und **Sören Fornoff** für ihr Bemühen um den Ausdruck und die Grammatik und bei **Anke Forcheim** für ihre hilfreiche Einführung in die Fotobearbeitung.

Mein besonderer Dank gilt meiner **Familie** und meinen **Freunden** für den Glauben an mein Können und die seelische und moralische Unterstützung auch in den schweren Zeiten.

---

## 9 Curriculum vitae

---

Name: Christina Schuster  
Geburtstag : 08.01.1979  
Geburtsort: Finsterwalde  
e-Mail-Adresse: schuster.christina@web.de

### Schulische Ausbildung

1985 – 1991 Oberschule Stadtmitte, Finsterwalde  
1991 – 1998 Janusz-Korczak-Gymnasium, Finsterwalde

### Berufsausbildung

1998 –2000 Oberstufenzentrum Werder in Werder/ Havel  
Abschluss: staatlich anerkannte BTA nach Landesrecht

### Studium

10/2002- 4/2008 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt  
07/2007 – 04/2008 Diplomarbeit am Julius Kühn-Institut für Biologischen Pflanzenschutz,  
Heinrichstraße 243, 64287 Darmstadt

### Berufliche Tätigkeiten

09/2000 – 08/2002 Tätigkeit als BTA in der BIOPLANT, Biotechnologisches Forschungslabor  
GmbH, Brüggerfeld 44, 29574 Ebstorf  
  
05/2008 – 01/2009 Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte am Julius Kühn-Institut für  
Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt

### Promotion

04/2009-09/2012 Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte zur Erlangung des  
Doktorgrades am Julius Kühn-Institut für Biologischen Pflanzenschutz,  
Darmstadt

---

## 10 Publikationen

---

Leclerque, A., Mitkovets, P.V., Fatu, A-C., Schuster, C., Kleespies, R.G. (2013): Ribosomal RNA phylogeny of bacterial and fungal pathogens of *Agriotes* wireworms. Journal of Pest Science (angenommen)

Leclerque, A., Kleespies, R.G., Schuster, C., Richards, N.K., Marshall, S.D.G., Jackson, T.A. (2012): Multilocus sequence analysis (MLSA) of '*Rickettsiella costelytrae*' and '*Rickettsiella pyronotae*', intracellular bacterial entomopathogens from New Zealand. Journal of Applied Microbiology 113, 1228 - 1237

Schuster, C., Kleespies, R.G., Ritter, C., Feiertag, S., Leclerque, A. (2012): Multilocus sequence analysis (MLSA) of '*Rickettsiella agriotidis*', an intracellular bacterial pathogen of *Agriotes* wireworms. Current Microbiology, DOI 10.1007/s00284-012-0219-z

Kleespies, R.G., Marshall, S.D.G., Schuster, C., Townsend, R.J., Jackson, T.A., Leclerque, A. (2011): Genetic and electron-microscopic characterization of *Rickettsiella* bacteria from the manuka beetle, *Pyronota setosa* (Coleoptera: Scarabeidae). Journal of Invertebrate Pathology 107, 206 – 211

Leclerque, A., Hartelt, K., Schuster, C., Jung, K., Kleespies, R.G. (2011): Multilocus sequence typing (MLST) for the infra-generic taxonomic classification of entomopathogenic *Rickettsiella* bacteria. FEMS Microbiology Letters 324, 125 – 134

Leclerque, A., Kleespies, R.G., Ritter, C., Schuster, C., Feiertag, S. (2011): Genetic and electron-microscopic characterization of '*Rickettsiella agriotidis*', a new *Rickettsiella* pathotype associated with wireworm, *Agriotes* sp. (Coleoptera: Elateridae). Current Microbiology 63, 158 - 163

Schuster, C., Ritter, C., Kleespies, R.G., Feiertag, S., Leclerque, A. (2011): Natural infection of wireworm, *Agriotes* sp. (Coleoptera, Elateridae), with *Rickettsiella* bacteria. IOBC/ wprs Bulletin Vol. 66, 513 - 516

Schuster, C., Konstantinidou-Doltsinis, S., Schmitt, A. (2010): *Glycyrrhiza glabra* extract protects plants against important phytopathogenic fungi. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University, Vol. 75 (4), S. 531-540

Scherf, A., Schuster, C., Marx, P., Gärber, S., Konstantinidou-Doltsinis, S.; Schmitt, A. (2010): Control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of greenhouse grown cucumbers with alternative biological agents. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University, Vol. 75 (4), S. 541-554

---

## 11 Eigene Arbeit

---

Die Experimente, Analysen der Daten und das Schreiben der vorliegenden Doktorarbeit wurde bis auf folgende Ausnahmen von mir selbst durchgeführt.

### Kapitel 3.1.6

Herr Dr. Schütze vom JKI, Institut für Ökologische Chemie, Analytik und Vorratsschutz in Quedlinburg untersuchte für diese Doktorarbeit den Gramicidin S-Gehalt der Proben von *A. migulanus* mittels semiquantitativer Massenspektrometrie.

### Kapitel 3.2.2

Frau Dipl.-Biologin M. Hinze von bio-ferm GmbH in Konstanz (früher Bio-Protect GmbH) leitete und überwachte die Kultivierung von *A. migulanus* im 7 L-Fermenter sowie in Erlenmeyerkolben, die in Konstanz durchgeführt wurden. Diese *A. migulanus*-Produktionen wurden für die Versuche unter Praxisbedingungen verwendet.

### Kapitel 3.3.1, 3.3.3, 3.3.4 und 3.3.5

Die Dokumentation und Beschreibung, die Ermittlung der Zell- und Sporengehalte von verschiedenen *A. migulanus*-Varianten sowie die Bestimmung ihrer Gramicidingehalte wurde von Frau Dipl.-Biologin Sandra Wölflé in Rahmen ihrer Diplomarbeit unter meiner Anleitung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in ihrer Diplomarbeit bereits veröffentlicht [Wölflé 2010].

### Kapitel 3.3.7

Herr Dr. Felgentreu vom JKI, Institut für Ökologische Chemie, Analytik und Vorratsschutz in Berlin führte die Fettsäureanalyse der *A. migulanus*-Phänotypen durch.



---

## Anhang

---

### A.1 Bestimmung der effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ )

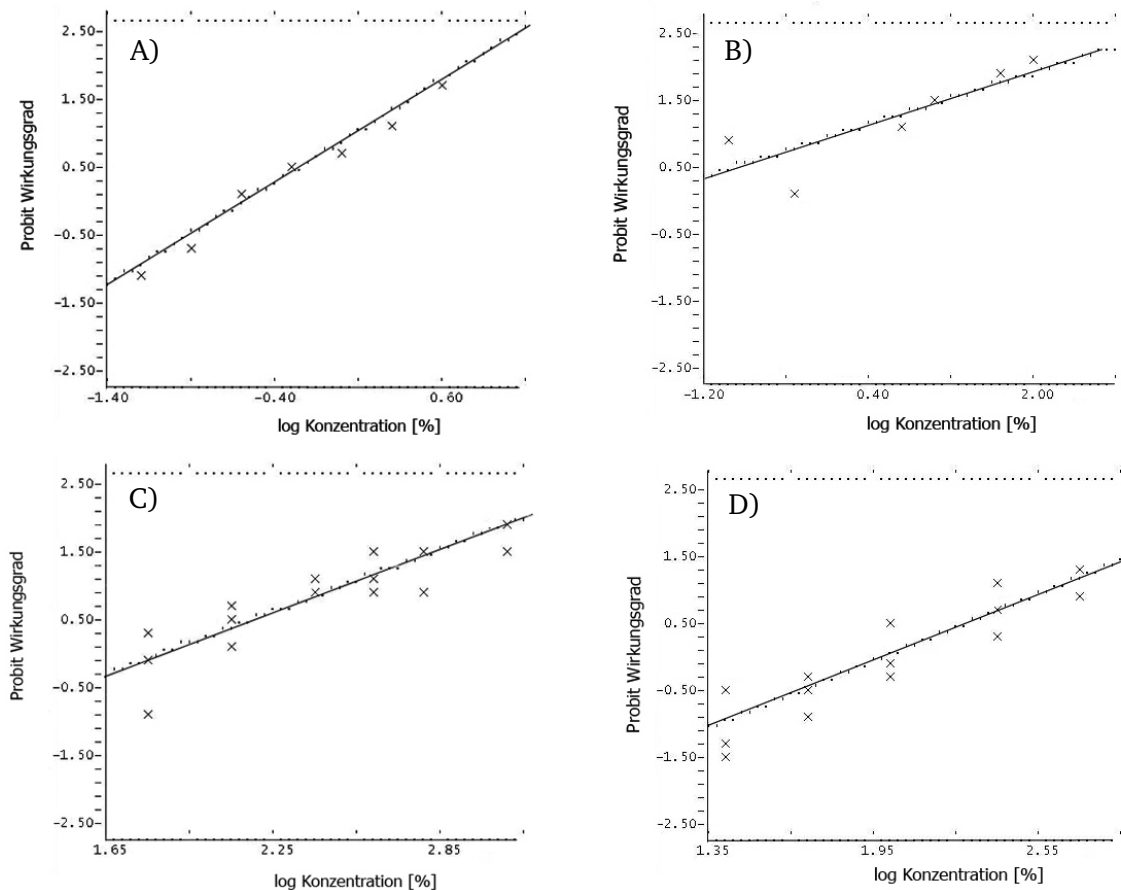
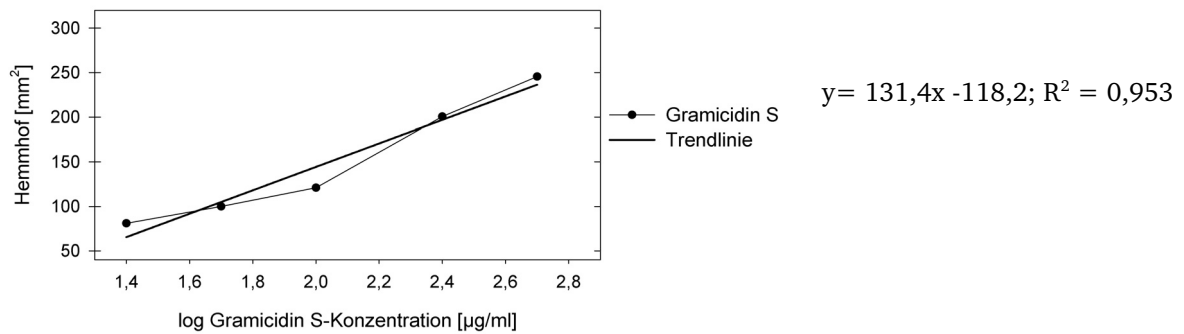


Abb. A-1: Graphen der Probit-Analysen aus Kapitel 3.1.1. A) Konzentrationsreihe mit *M. cordata* (40 – 0,63  $\mu\text{g/ml}$ ), *M. cordata*-Extrakt (1000 – 5  $\mu\text{g/ml}$ ), C) *A. migulanus*-Flüssigkultur und D) reines Gramicidin S.

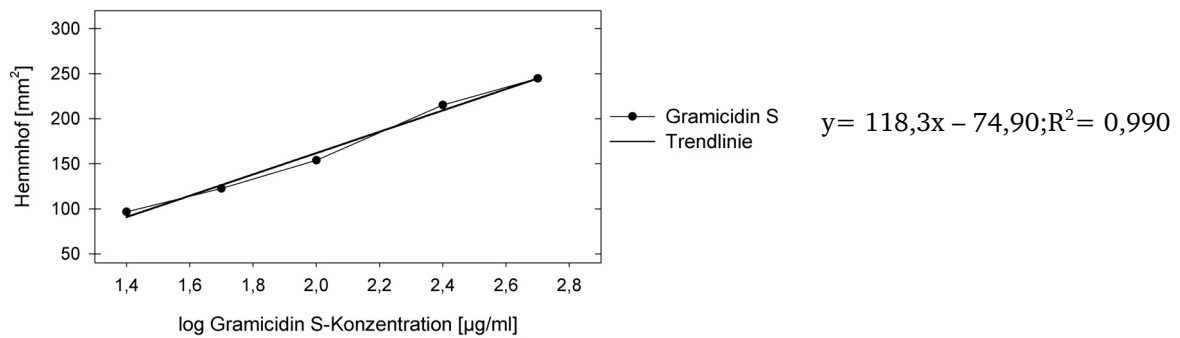
### A.2 Gramicidin S-Standardkurve für die Hemmhoftests

Für die Erstellung der Standardkurven für die Bestimmung unbekannter Gramicidingehaltes der Proben wurde reines Gramicidin S (Sigma) in den Konzentrationen 25 – 500  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Anhand der daraus entstandenen Trendlinien wurden anschließend die Gramicidinkonzentrationen berechnet.

A) Standardkurve Gramicidin S



B) Standardkurve Gramicidin S



Standardkurve Gramicidin S

C)

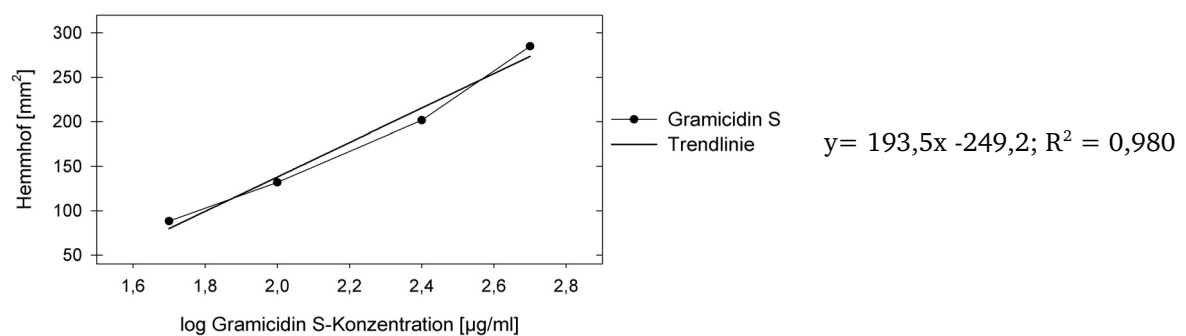


Abb A-2: Gramicidin S Standardkurve mit dazugehöriger Geradengleichung zur Bestimmung unbekannter Gramicidingehalte. Es wurden die Hemmhofdurchmesser in mm<sup>2</sup> (y) gegen den Logarithmus der Gramicidinkonzentration in µg/ml (x) aufgetragen. A) Bestimmung der Gramicidingehalte der *A. migulanus* Kultur in Kapitel 3.1.8.1, B) Bestimmung der Gramicidingehalte der Vergleiche der Kultivierung von *A. migulanus* auf TSB oder TSA in Kapitel 3.2.1.2, C) Bestimmung der Gramicidingehalte der verschiedenen *A. migulanus* Phänotypen in Kapitel 3.3.3

### A.3 Wirkung von *M. cordata* als Saatgutbeizmittel gegen Möhrenschröcke

Tab. A-1: Übersicht der erhaltenen Daten und verschiedener Verrechnungen der Daten aus dem Versuch zur Möhren-Saatgutbeizung (Kapitel 3.4.2), M.c. = Extrakt aus *M. cordata*.

	H <sub>2</sub> O	M.c. 0,1 mg/ml	M.c. 1 mg/ml	Thiram 1%
Anzahl insgesamt ausgesäte Samen	295	288	300	300
Anzahl aufgegangene gesunde Pflanzen	50	51	160	220
Anzahl aufgegangene kranke Pflanzen	29	41	30	8
Anteil der insgesamt aufgegangenen Pflanzen in Bezug zu allen ausgesäten Samen [%]	26,8	31,9	63,3	76,0
Anteil gesunder Pflanzen in Bezug zu allen ausgesäten Samen [%]	16,9	17,7	53,3	73,3
Anteil gesunder Pflanzen in Bezug auf alle aufgegangenen Samen dieser Variante [%]	63,3	55,4	84,2	96,5
Anteil infizierter Pflanzen in Bezug auf alle aufgegangenen Samen dieser Variante [%]	36,7	44,6	15,8	3,5
Anteil gesunder Pflanzen in Bezug auf die Fungizidkontrolle (= 100 %) [%]	22,7	23,2	72,7	100

### A.4 Sequenzanhang

Tab. A-2: Nukleotidsequenzen der 16S rDNA der Phänotypen von *A. migulanus*-Stämme und von Nr. 10, Sequenzen (Kapitel 3.3.1) wurden mit dem Primern fD1 und rP2 erstellt.

Stamm	Sequenz 5' – 3'
<i>A. migulanus</i> WT	CATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGG ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGA AACC GGAGCTAATACCGGATACTTCTTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAA GACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACNATGAAGTTT TCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCGCCGGGATGACCTCCCGGT CTGACGGTACCTAACGAGAAAAGCCCCGGCTAACTACNTGCCAGCANCCGCGGT AATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG GCGGCTTCTTAAGTCAGGTGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCACT TGAAACTGGGAAGCTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGC GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCGGGTCTCTG GCCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCTTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA CCCTGGTNGTCCACGCCGTAAACGTTGAGTGCTAGGTGTTGGGGACTCCAATC CTCAGTGCCGCGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCTGGGGAGTACNGCCGCAA GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGNNNNAGCNGTGGAGCATGTG GTTTAATTGGAAGNAACGCGAAGAANCTTACCNGGGCTTGACNTCCCNNTGAC CCTCCNASAGATAGGAGCTNTCTTCGGAGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGT TGTCGTCAGCTCNTGTCNWGAGATGTTGG

<i>A. migulanus</i> weiß	CATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTAGCGGCGG ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGA AACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAA GACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACNATGAAGGTTT TCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAANAACCGCCGGGATGACCTCCCGGT CTGACGGTACCTAANGAGAAAAGCCCCNGNTAACTACTTGCCAGCANCCGCGGT AATACNTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG GCGGCTTCTTAAGTCAGGTGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGGCCACT TGAAACTGGTTAANCTTGANTGCNNGAGAGGAGAGCNAATTCCACNTGTAG CGNTGAAATGCGTATAGATGTGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG GNCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGAGTGCTAGGTGTTGGGGACTCCAAT CCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTNGGGAGTNCGGCCGCA AGGNTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCRGTGGAGCATGT GGTTTAATTGGAAGNAACGCNAAGAACCTTACCAGGGCTTGACNTCCCGCTGA CCCTCCTAGAGATAGGAGCTCTCTTCGGAGCAGCGGTGACNNGTGGTGCATGG TTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA CCCTTGTCCTTANTTGCCAGCATTTGGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGTC NACAANACGGANGAAGGTGGGGATGACNTCAAATCNTCATGCCCTTATGTCC TGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAACGGGCAGCC
<i>A. migulanus</i> E1	ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGANCNANACCGGATACTTCTTTTCAGACCG CATGGTCTGAAAGGGAAAGACYTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCA TTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCT GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCANACTCCTACGGG AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC GCGTGAACGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTCAGGTGTGAAAGCCCACGG CTCAACCGTGAGGGGCCACTTGAAACTGGGAAGCTTGAGTGACAGGAGAGGAG AGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCCG TGCGGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGAGTGCT AGGTGTTGGGGACTCCAATCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCG CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCA GGGCTTGACATCCCGCTGACCTCCTAGAGATAGGAGCTCTCTTCGGAGCAGC GGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTGCCAGCATTTGGTTGGGCA CTCTAGGGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAA TCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAC GGGCAGCCAACTCGCGAGAGTGCAGCAATCCCTTNAACCATTCTCAGTTTCGG ATTGCAGGCTGCAACTCGNCTGCATGAAGCCGGANTCNCTAGTANTCNCGGAT CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACNACCNCCCGTCACNM CACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCG
<i>A. migulanus</i> transluzent	GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC CCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTTTTCG GATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTG ACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA ACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGC

	GGCTTCTTAAGTCAGGTGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCACTTG AAACTGGGAAGCTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCACGTGTAGCGG TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCC TGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGAGTGCTAGGTGTTGGGGACTCCAATCCTC AGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCTGACCCTC CTAGAGATAGGAGCTCTCTTCGGAGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT GTCCTTAGTTGCCAGCATTTGGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGTCGACAA GACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCTGGGC TACACACGTGCTACAATGGATGGAACAACGGGCAGCCAACTCGCGAGAGTGCG CGAATCCCTTAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAT GAAGCCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC CGGGTCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGT CG
<i>A. migulanus</i> Bioprotect	CGTTGTGCGGATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTCAGGT GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCACTTGAAACTGGGAAGCTTGAG TGCAGGAGAGGAGAGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG TGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACGCTGAGG CGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGTTGAGTGCTAGGTGTTGGGGACTCCAATCCTCAGTGCCGCAGCTAACGC AATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGSTGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA AGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCTGACCCTCCTAGAGATAGGAGCTCT CTTCGGAGCAGCGGTGAYRGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCTGA GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCA TTTGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGTCGACAANACGGAGGAAGGTGGG GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAAT GGATGGAACAACGGGCAGCCNACTCGCGAGAGTGCGCGAATCCCTTNAACCA TTCTCANTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGNCTGCATGAAGNCGGAATCNCTA GTARTCRCNGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACNCAC CNCCCGTCACRNCNCGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCG
Stamm Nr. 10	CATGCAAGTCGAGCGAGTCTCTTCGGAGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA CGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATA CCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCCGAAAAGAAAAGGCGGCTTTAAGCTG TCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTA CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAAT GGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTCTTCGGATTG TAAAGTTCTGTTGTTAGGGACGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTT GACGGTACCTGACGAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGC GGCTATGTAAGTCTGGTGTAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGTTCGCATCGGA AACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTG AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGGCTTTCTGGTCTG TAACTGACGCT

---

## A.5 Geräte und Materialien

DC-Plastikfolien Cellulose (# 5577)	Merck KgaA, Darmstadt
Glas-Sprüher	Desaga GmbH, Wiesloch
Lampen Klimaraum: L30W/ 77	Osram AG, München
Mikroskop Kamera: Moticam 2300 USB 2.0	Beyersdörfer GmbH, St. Ingberg
Olympus	Olympus GmbH, Hamburg
Mikroskop: Axioscope 2	Carl Zeiss AG, Jena
Aristoplan	Leica Microsystems, Wetzlar
Photometer: BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Real-Time PCR: DNA Engine Opticon	MJ Research Inc, St. Bruno
Thermocycler: Biometra TGradient	Biometra GmbH, Jena

## A.6 Chemikalien

1 kb DNA Leiter	New England BioLabs Inc., Ipswich UK
100 bp DNA Leiter	New England BioLabs Inc., Ipswich UK
Agar-Agar	INSULA Gewürz-Backzutaten GmbH, Mannheim
Blankophor	Geschenk von Dr. Koch, JKI Darmstadt
DAB	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gramicidin S	Sigma-Aldrich (wird nicht mehr hergestellt)
Neo-Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ninhydrin	Merck KgaA, Darmstadt
PCR Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Trypton Soja Brühe (TSB)	Otto Nordwald GmbH, Hamburg
andere Chemikalien	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

---

## A.7 Kits

DNase I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNeasy Plant Mini Kit	Quiagen GmbH, München
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories Inc., München
NucleoSpin RNA Plant Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Polymerase Taq core Kit	Quiagen GmbH, München
SYBR Green Master Mix Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

## A.8 Software

Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems Irland, Dublin
Berechnung der EC <sub>50</sub>	MLP Version 3.08
Geldokumentation	InGenius Syngene Bio Imagin, Syngene, Cambridge
Mega 5	<a href="http://www.megasoftware.net/">http://www.megasoftware.net/</a>
Opticon Monitor	MJ Research Inc., St Bruno
PhyML	<a href="http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/versions.php">http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/versions.php</a>
Programm Kamera: Motic	Motic Images Plus 2.0, Beyersdörfer GmbH
Olympus	AnalySIS docu, Olympus GmbH
SAS 9.3 für Windows	SAS-Institute, Cary, North Carolina
TreePuzzle	<a href="http://www.tree-puzzle.de/">http://www.tree-puzzle.de/</a>

